

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Journal of Chromatography Library—Volume 12

AFFINITY CHROMATOGRAPHY

JAROSLAVA TURKOVÁ

**Institute of Organic Chemistry
and Biochemistry,
Czechoslovak Academy of Sciences,
Prague**

**Elsevier Scientific Publishing Company
Amsterdam—Oxford—New York**

Я. ТУРКОВА **Аффинная
хроматография**

Перевод с английского
канд. хим. наук Л. В. Козлова

Издательство «Мир»
Москва 1980

Я. ТУРКОВА **Аффинная
хроматография**

Перевод с английского
канд. хим. наук Л. В. Козлова

Издательство «Мир»
Москва 1980

Книга посвящена новому методу хроматографии, развиваемому многими ведущими лабораториями мира и являющемуся весьма перспективным в области химии белка, энзимологии и иммунологии. Он позволяет изолировать необходимое вещество в активном состоянии, с высокой степенью очистки и со значительно большей эффективностью по сравнению с другими видами хроматографии.

Предназначена для научных работников, специализирующихся во многих областях биоорганической химии, молекулярной биологии и биохимии. Ее можно использовать также в качестве учебного пособия для аспирантов и студентов старших курсов химических, биологических и медицинских вузов.

Редакция литературы по химии

СТ ПЕРЕВОДЧИКА

В последние годы метод аффинной хроматографии благодаря своей высокой эффективности стал одним из ведущих методов выделения и очистки природных соединений. Его применение, однако, не ограничивается только выделением соединений, находящихся — часто в очень небольших концентрациях — в смеси с близкими к ним по свойствам веществами. Специфическое комплексообразование позволяет применять этот метод и для отделения биологически активных молекул от денатурированных, например после модифицирования белка, а также и для исследования самого процесса комплексообразования, определения констант устойчивости комплексов и установления различных факторов, оказывающих влияние на этот процесс.

Однако кажущаяся простота метода и отсутствие у новичка представления о возможных трудностях, сопровождающих его применение на практике, могут привести к обескураживающим неудачам. Действительно, трудно заранее предугадать, какой аффинный лиганд полезнее выбрать — с высоким или низким сродством, какова наиболее благоприятная концентрация этого лиганда в сорбенте, какую роль должна играть матрица, какие носители подходят и какие не подходят для иммобилизации аффинного лиганда. Например, отлично зарекомендовавшие себя с точки зрения иммобилизации ферментов носители на основе кремнезема оказываются в ряде случаев совершенно непригодными для использования в аффинной хроматографии из-за высокой неспецифической сорбции.

До сих пор не существовало никакого систематического руководства по практическому применению аффинной хроматографии. Поэтому выход в свет данной книги имеет особое значение. Она представляет собой фундаментальное исследование: в ней излагаются теоретические основы метода и подробно обсуждается его практическое приложение для решения конкретных вопросов.

Как и во всякой новой области, терминология в аффинной хроматографии еще четко не определилась. Это касается даже самого названия метода. В литературе наряду с термином «аффинная хроматография» часто встречается термин «биоспецифическая хроматография». Тем более отсутствует согласование в других

терминах. Так, в журналах, выходящих на русском языке, группа атомов, расположенная между лигандом и носителем, называется «ножкой», в то время как в английской литературе — агт («ручкой»); вместо термина *спасег*, как правило, у нас применяют обозначение «пространственная группа», что не совсем точно, хотя в какой-то степени и отражает протяженность этой группы. Наряду с обычно используемым нанесением вещества на колонку в аффинной хроматографии применяется так называемая одноразовая сорбция или сорбция в статических условиях, при которой раствор, содержащий сорбируемое вещество, длительное время перемешивается в стакане с аффинным сорбентом. Такой метод достижения равновесия в английской литературе называется *batchwise*. В данной книге этот термин переводится как «одноразовый метод» или «сорбция в статических условиях», что тоже не совсем точно, но, по-видимому, наиболее близко отражает суть дела, поскольку сорбент не находится в режиме непрерывного потока раствора через колонку. При дальнейшем развитии метода аффинной хроматографии терминология, безусловно, будет уточняться.

Книга Я. Турковой, являющейся известным специалистом в области энзимологии, иммобилизованных ферментов и аффинной хроматографии, несомненно послужит полезным руководством как для студентов и аспирантов, специализирующихся в самых различных областях биохимии, молекулярной биологии и биоорганической химии, так и для исследователей различных специальностей, которым приходится заниматься выделением и очисткой биологически активных природных соединений, изучать их свойства с помощью специфического комплексообразования, а также применять этот метод в медицине, химической и микробиологической промышленности.

Л. Козлов

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Исследование и применение биологически активных природных веществ, и прежде всего ферментов, ограничены значительными трудностями, которые сопровождают их выделение. Поскольку подобные вещества встречаются в природном сырье, как правило, в смеси с очень многими похожими на них соединениями и, кроме того, в очень низких концентрациях, метод их выделения с использованием аффинной хроматографии, основанной на образовании выделяемыми веществами специфических комплексов, является очень прогрессивным. По этой причине число работ, в которых применяется этот метод, быстро увеличивается.

Первоначально передо мною стояла цель сделать обзор выделенных методом аффинной хроматографии веществ, а также кратко обсудить наиболее существенные моменты, знание которых необходимо для успешного применения этого метода. Однако изучение литературы привело меня к мысли о том, что аффинная хроматография далеко не ограничивается выделением веществ. В связи с тем что в ее основе лежит образование специфических комплексов, например ферментов с их ингибиторами, антител с антигенами, лектинов с сахарами и гликопротеинами и т. д., аффинная хроматография является весьма полезной также и при изучении этих специфических взаимодействий.

В процессе написания книги обнаружилась необходимость рассмотрения нерастворимых носителей, методов иммобилизации и иммобилизованных ферментов. В результате расширения круга затрагиваемых вопросов запланированный первоначально объем книги был превзойден.

Литература, цитируемая в книге, охватывает работы до конца 1976 г. Делая этот обзор, я хотела показать широкое применение аффинной хроматографии в разных областях биохимии, микробиологии, клинической химии и т. д. и ее возможности не только при исследованиях, но и для производства. Поскольку я убеждена в том, что возможности аффинной хроматографии далеко не исчерпаны, я бы хотела, чтобы данная книга использовалась не только как источник информации, обобщающий накопленный опыт, но и как стимул для новых теоретических исследований и помощи при решении практических вопросов.

Поэтому я очень рада выходу книги на русском языке, что, как я надеюсь, в значительной мере увеличит число поклонников метода аффинной хроматографии, которым я бы хотела пожелать больших успехов в дальнейшем при применении и развитии этого действительно очень перспективного метода.

Я. Туркова

БЛАГОДАРНОСТИ

Я бы хотела выразить свою глубочайшую признательность профессору кафедры 3-го лечебного отделения медицинского факультета Карлова университета (Прага) Карелу Мацеку за постоянный интерес к данной книге, который он проявил при ее написании, а также за ценные советы и замечания, которые очень помогли мне. Я благодарю также профессора кафедры Института органической химии и биохимии Чехословацкой академии наук (Прага) Карела Благу за любезное согласие ознакомиться с рукописью и многие ценные предложения. Профессору кафедры Пенсильванского университета (Филадельфия) Дэвиду Дж. Грейвсу и профессору Токийского университета Акиоши Вада я благодарна за ознакомление с главой, посвященной теории аффинной хроматографии, и полезные замечания. Я благодарю доктора Желимира Прохазку за перевод рукописи на английский язык. Я также благодарна Владимиру Маржику за подготовку рисунков.

В заключение я выражаю благодарность моей матери, мужу и дочерям за проявленное внимание во время работы над книгой.

Введение

Макромолекулы, такие, как белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты, внутри своих индивидуальных групп отличаются по физико-химическим свойствам лишь незначительно; поэтому их выделение, основанное на различиях в этих свойствах, например, с помощью ионообменной хроматографии, гель-фильтрации или электрофореза сопряжено с известными трудностями и требует много времени. Вследствие этого в ходе выделения существенно падает их активность из-за денатурации, расщепления, ферментативного гидролиза и т. п. Одним из наиболее характерных свойств этих биологических макромолекул является их способность обратимо связывать другие вещества. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами или ингибиторами, антитела — с антигенами (против которых получены), а нуклеиновые кислоты, такие, как информационная РНК, гибридизуются с комплементарными ДНК и т. д. Образование специфических диссоциирующих комплексов биологических макромолекул служит основой метода их очистки, известного как аффинная хроматография.

Однако термин «аффинная хроматография» вызывал (и все еще продолжает вызывать) много возражений. Делались попытки заменить его более точным: например, «биоспецифическая адсорбция» или «биоаффинная хроматография» [29, 31], в особенности когда было найдено, что ряд сорбентов, в особенности такие, которые связываются с синтетическими ингибиторами своей гидрофобной углеводородной цепью, могут сорбировать макромолекулы в результате преимущественно гидрофобных взаимодействий [28]. Использование комплексообразования биологических макромолекул, основанного на гидрофобных взаимодействиях, положило начало гидрофобной хроматографии [38]. Однако во многих случаях провести четкую границу между биоспецифическим комплексом и комплексом, образующимся в результате действия неспецифических гидрофобных взаимодействий, не так просто, как могло бы показаться на первый взгляд. Часто одно и то же вещество, привязанное к носителю, с одной группой макромолекул может образовывать биоспецифические комплексы, в то время как с другой оно может давать комплексы исключительно благодаря неспецифическим гидрофобным взаимодействиям, а в образовании

связей с третьей группой макромолекул могут принимать участие оба типа взаимодействий. В качестве примера можно привести гексаметилендиамин. Это соединение, будучи привязанным к сепарозе, использовано Гендерсоном и др. [18], а также Якубовским и Павелкевичем [21] в качестве сорбента для гидрофобной хроматографии аминоксил-тРНК-синтетаз и L-гистидинолфосфатаминопотрансфераз. Торая и др. [40] предложили его в качестве биоспецифического сорбента для аминоксидазы из *Aspergillus niger*, в то же время Восбек и др. [44], выделяя с помощью того же сорбента аминопептидазы из *Streptomyces griseus*, не пришли к определенному заключению о типе связи, образующейся при специфической сорбции. Поэтому логически объяснимо, почему Якоби и Вильчек [20] среди аффинных методов, т. е. методов биоспецифической сорбции, рассматривали не только аффинную хроматографию, но также гидрофобную хроматографию (Шальтиель [38]), ковалентную хроматографию (Бламберг и Строминджер [2], Броклехурст и др. [3]), аффинную элюцию (Хаар [43]), аффинное изменение плотности (Валлах [45]) и аффинный электрофорез (Хорейши и Кодоурек [19]). Недавно термин «аффинная хроматография» был еще более расширен отнесением к нему металлохелатной аффинной хроматографии (Порат и др. [33]) и матричной хроматографии, нашедшей применение при исследованиях взаимодействий на носителях со связанными олигонуклеотидами (Шотт и др. [37]).

Из сказанного выше видно, что в настоящее время термин «аффинная хроматография» распространяется не только на методы, основанные на образовании комплексов в результате строго биоспецифических взаимодействий. Напротив, этот термин стал настолько широким, что используется также и для обозначения метода выделения биологических макромолекул путем простой сорбции на специфическом сорбенте (который часто бывает даже одноразового употребления). По-видимому, этот термин не совсем точен, но сегодня он общепринят.

Идея методов разделения белков, основанная на сродстве молекул, которое обнаружено в биологических системах, известна несколько десятилетий (с тех пор, как стали привязывать ферменты к нерастворимым носителям). Нерастворимые гетерогенные катализаторы имеют определенные преимущества: легкость выделения из реакционной смеси, возможность осуществления непрерывного катализа и повышение стабильности ферментов. Тем не менее по ряду причин полного развития аффинная хроматография и связывание ферментов с нерастворимыми носителями достигли лишь в последние годы. Развитие обоих направлений началось с использования высокопористых гидрофильных носителей, главным образом агарозы, после разработки подходящих методов связывания (Аксен и др. [1], Порат и др. [32]).

В основе принципа аффинной хроматографии лежит отличительная особенность биологически активных веществ образовывать стабильные, специфические и обратимые комплексы. Если иммобилизовать один из компонентов комплекса, то получится специфический сорбент для второго его компонента, при этом, разумеется, предполагается, что соблюдаются все условия, необходимые для образования этого комплекса. Связывающие участки иммобилизованных веществ должны сохранять хорошую стерическую доступность для второго участника комплекса даже после связывания с нерастворимым носителем и не должны деформироваться. Примерами первых специфических сорбентов, приготовленных путем ковалентного связывания с нерастворимым носителем, были иммобилизованные антигены (Кемпбелл и др. [5]) *. Методы, созданные для присоединения антигенов и антител к нерастворимым носителям, были сразу же применены для получения иммобилизованных ферментов. В то же время ранее предложенный азидный способ привязки ферментов к целлюлозе [25] стал использоваться для приготовления иммуносорбентов. Параллельное развитие обоих направлений, основанных на использовании связывания биологически активных веществ с нерастворимыми носителями, наглядно демонстрируют названия первых обзорных статей: «Реакционноспособные полимеры и их использование для приготовления смол с антителами и ферментами» (Манеке [23]), «Водонерастворимые производные ферментов, антигенов и антител» (Сильман и Качальский [39]) и «Химия и использование производных целлюлозы для изучения биологических систем» (Великий и Витол [47]). Оба направления продолжали развиваться параллельно и после открытия других более эффективных носителей и разработки методов связывания, позволяющих сохранять свойства иммобилизуемых веществ в растворе.

Такое параллельное развитие существенно способствовало созданию новой отрасли технологии — ферментной инженерии. Согласно Виньяру [48], последняя включает производство, выделение, очистку, иммобилизацию и использование ферментов в различного типа реакторах. Практическое использование ферментов стало возможным благодаря новейшим достижениям энзимологии, а именно: после выяснения структур и механизмов действия ряда ферментов, имеются большие возможности для практического применения иммобилизованных ферментов в анализе, медицине и промышленности. Упрощение процесса выделения ферментов с помощью аффинной хроматографии, по-видимому, может привести к получению недорогих ферментов в требуемых количествах.

* Сорбционная иммобилизация на угле с целью исследования взаимодействий антиген — антитело впервые была, по-видимому, описана в работе советского ученого В. А. Энгельгардта [Biochem. Z., 1924, 148, 463], назвавшего этот принцип «методом фиксированного партнера». — *Прим. перев.*

Иммобилизация ферментов на подходящих носителях значительно расширяет сферы их применения, которые, кроме того, стали и экономически целесообразными. Исследование различных типов ферментативных реакторов создает условия для их практического применения. Однако потребуются еще много усилий для воплощения мечты энзимологов о том, чтобы ферменты как высокоспецифические катализаторы проникли в процессы производства. К сожалению, до сих пор имеется некоторый скептицизм относительно возможности достижения этой цели.

Однако ферменты, связанные с нерастворимыми подложками, важны не только с практической точки зрения. Ферменты, присоединенные к нерастворимым подложкам, имеющим хорошо охарактеризованную поверхность, представляют собой простые модели для изучения влияния микроокружения на связывание субстрата, а также на общий ход катализа, что имеет несомненно и теоретический интерес. Поскольку большинство ферментов *in vivo* связаны с мембранами или находятся в виде каких-то других комплексов в естественном окружении, исследования в этом направлении имеют особое значение.

Именно при изучении влияния микроокружения на специфические взаимодействия важную роль начинает играть метод аффинной хроматографии. Как подробно показано в гл. 4, возможно, например, использовать колонку с иммобилизованным ингибитором и вытеснять специфически сорбируемый фермент растворами его ингибиторов в различных концентрациях. На основе объемов элюата могут быть рассчитаны константы диссоциации фермента как со связанным, так и с растворенным ингибитором. Если использовать тот же ингибитор для связывания на нерастворимой подложке и для элюирования специфически сорбированного фермента, то информацию о влиянии окружения на образование комплекса можно получить, основываясь на различиях, если таковые имеются, в величинах определяемых констант диссоциации. Поскольку специфические взаимодействия играют очень важную роль в большинстве процессов, протекающих в природе, разработка простого метода определения констант диссоциации комплексов несомненно имеет важное значение.

Аффинной хроматографии и связыванию ферментов с нерастворимыми носителями посвящено много обзорных статей [4, 6—9, 11—17, 26, 30, 31, 34, 35, 41, 42, 46].

Кроме того, вышли в свет труды симпозиума [10] и два больших тома «Методы энзимологии»: «Аффинные методы» [20] и «Иммобилизованные ферменты» [27], а также две монографии по иммобилизованным ферментам [24, 36] и одна по аффинной хроматографии [22].

Цель данной книги — обзор литературы, освещающей практическое применение аффинной хроматографии, а также, что явля-

ется особенно важным, сведений о носителях, аффинных лигандах и пространственных группах. Кроме того, в книге приводятся сведения о ферментах, ковалентно связанных с нерастворимыми носителями, если эти ферменты использовались для аффинной хроматографии при выделении их ингибиторов или кофакторов либо при изучении механизма ферментативного действия или участия в метаболических путях. В ней также кратко изложены принципы аффинной хроматографии, которые необходимы для ее успешного использования, и последние достижения в этой области. Особое внимание в книге уделено нерастворимым носителям, применяемым как для аффинной хроматографии, так и для связывания ферментов, и использованию аффинной хроматографии для количественной оценки комплексообразования и влияния носителя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Axén R., Porath J., Ernback S., *Nature* (London), **214**, 1302—1304 (1967).
2. Blumberg P. M., Strominger J. L., *Methods Enzymol.*, **34**, 401—405 (1974).
3. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M., *Methods Enzymol.*, **34**, 531—544 (1974).
4. Brümmer W., *Kontakte* (Merck), **1/74**, 23—29 (1974); **2/74**, 3—13 (1974).
5. Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **37**, 575—578 (1951).
6. Crook E. M., Brocklehurst K., Wharton C. W., *Methods Enzymol.*, **19**, 963—978 (1970).
7. Cuatrecasas P., *Advan. Enzymol.*, **36**, 29—89 (1972).
8. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., *Methods Enzymol.*, **22**, 345—378 (1971).
9. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 259—275 (1971).
10. *Advan. Exp. Med. Biol.*, R. B. Dunlap (Ed.), **42**, 1—377 (1974).
11. Falb R. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **S3**, 177—184 (1972).
12. Feinstein G., *Naturwissenschaften*, **58**, 389—396 (1971).
13. Friedberg F., *Chromatogr. Rev.*, **14**, 121—131 (1971).
14. Goldman R., Goldstein L., Katchalski E., in: *Biochemical Applications of Reactions on Solid Supports*, G. R. Stark (Ed.), Academic Press, New York, 1971, pp. 1—78.
15. Goldstein L., *Methods Enzymol.*, **19**, 935—962 (1970).
16. Gruszkiewicz J., *Folia Biol.*, **19**, 119—150 (1971).
17. Guilford H., *Chem. Soc. Rev.*, **2**, 249—270 (1973).
18. Henderson G. B., Shattiel S., Snell E. E., *Biochemistry*, **13**, 4335—4338 (1974).
19. Horéjsi V., Kocourek J., *Methods Enzymol.*, **34**, 178—181 (1974).
20. *Methods Enzymol.*, W. B. Jakoby, M. Wilchek (Eds.), **34**, 1—810 (1974).
21. Jakubowski H., Pawelkiewicz J., *FEBS Lett.*, **34**, 150—154 (1973).
22. Lowe C. R., Dean P. D. C., *Affinity Chromatography*, Wiley, London, 1974, pp. 272.
23. Manecke G., *Pure Appl. Chem.*, **4**, 507—520 (1962).
24. *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, R. A. Messing (Ed.), Academic Press, New York, 1975, pp. 232.
25. Micheel F., Ewers J., *Makromol. Chem.*, **3**, 200—209 (1949).
26. Mosbach K., *Scient. Amer.*, **224**, 26—33 (1971).
27. *Methods Enzymol.*, K. Mosbach (Ed.), **44**, 1—999 (1977).
28. O'Carra P., *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1289—1293 (1974).
29. O'Carra P., Barry S., Griffin T., *Methods Enzymol.*, **34**, 108—126 (1974).

30. Orth H. D., Brümmer W., *Angew. Chem.*, **84**, 319—330 (1972).
31. Porath J., *Biochemie*, **55**, 943—951 (1973).
32. Porath J., Axén R., Ernback S., *Nature (London)*, **215**, 1491—1492 (1967).
33. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., *Nature (London)*, **258**, 598—599 (1975).
34. Porath J., Kristiansen T., in: *The Proteins*, H. Neurath, R. L. Hill (Eds.), Academic Press, New York, 3rd ed., 1975, pp. 95—178.
35. Reiner R. H., Walch A., *Chromatographie*, **4**, 578—587 (1971).
36. *Insolubilized Enzymes*, M. Salmona, C. Saronio, S. Garattini (Eds.), Raven Press, New York, 1974, pp. 226.
37. Schott H., Eckstein H., Bayer E., *J. Chromatogr.*, **99**, 31—34 (1974).
38. Shaltiel S., *Methods Enzymol.*, **34**, 126—140 (1974).
39. Silman I. H., Katchalski E., *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 873—908 (1966).
40. Toraya T., Fujimura M., Ikeda S., Fukui S., Yamada H., Kumagai H., *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 316—322 (1976).
41. Turková J., *J. Chromatogr.*, **91**, 267—291 (1974).
42. Turková J., in: *Liquid Column Chromatography*, Z. Deyl, K. Macek, J. Janák (Eds.), Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, 1975, pp. 89—97, 215—231, 369—376.
43. Von der Haar F., *Methods Enzymol.*, **34**, 163—171 (1974).
44. Vosbeck K. D., Chow K. F., Awad Jr. W. M., *J. Biol. Chem.*, **248**, 6029—6034 (1973).
45. Wallach D. F. H., *Methods Enzymol.*, **34**, 171—177 (1974).
46. Weetall H. H., *Separ. Purif. Methods*, **2**, 199—229 (1973).
47. Wiliky N., Weetall H. H., *Immunochemistry*, **2**, 293—322 (1965).
48. Wingard Jr. L. B., *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 3—13 (1972).

Принцип метода аффинной хроматографии, историческая справка и применение

Аффинная хроматография (или, более точно, биоаффинная или биоспецифическая по сродству хроматография) основана на исключительной способности биологически активных веществ связывать специфически и обратимо другие вещества, называемые в общем случае лигандами или аффинными лигандами [16], или упрощенно аффинантами [19].

Если приготовить нерастворимый аффинант (обычно это делают путем ковалентной привязки к нерастворимой подложке) и раствор, содержащий биологически активные продукты, которые необходимо выделить, пропустить через колонку с этим аффинантом, то все соединения, которые в данных условиях эксперимента не обладают сродством к аффинанту, будут проходить не задерживаясь, а продукты, обнаруживающие сродство к нерастворимому аффинному лиганду, будут сорбироваться на колонке. Последные могут быть освобождены далее из комплекса с иммобилизованным лигандом, например, с помощью раствора растворимого аффинанта или путем изменения состава растворителя. Диссоциация комплекса часто может быть достигнута изменением pH, ионной силы или температуры либо с помощью специфических агентов, как это будет показано далее. Согласно О'Карра и др. [17], следует различать биоспецифическую десорбцию и небioso-специфическую десорбцию с помощью так называемых «деформирующих буферов», как показано схематически на рис. 2.1.

Аффинная хроматография как метод, по-видимому, впервые была применена Штаркенштайном в 1910 г. [21] для выделения α -амилазы с помощью нерастворимого субстрата (крахмала). Принцип аффинной хроматографии, использующий аффинанты, ковалентно связанные с нерастворимой матрицей, известен более 20 лет. Кемпбелл и др. [6] были, вероятно, первыми (1951 г.), в чьих работах этот принцип получил практическое приложение для выделения антител на колонке с целлюлозой с ковалентно присоединенным антигеном. Для выделения ферментов аффинная хроматография впервые была применена в 1953 г. Лерманом [15], который выделил тирозиназу на колонке с целлюлозой, эфирио связанной с остатками резорцина. В последующие годы аффинная хроматография использовалась весьма редко, что, очевидно, об-

условлено свойствами известных в то время нерастворимых подложек, которые ограничивали возможности образования комплексов между выделяемыми продуктами и присоединенными аффинантами. На подложках с гидрофобными или ионогенными группами часто наблюдалась неспецифическая сорбция.

Однако в последние несколько лет наблюдается широкое развитие метода. Толчком послужило открытие Поратом и сотр. [2, 3, 18] присоединения аффинанта к агарозе, активированной бром-

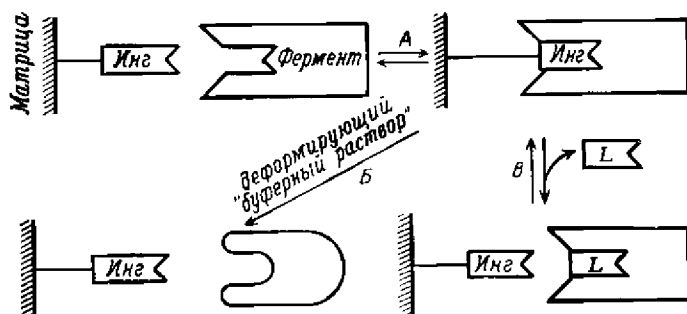


Рис. 2.1. Схема биоспецифической адсорбции (А), элюирования «деформирующим» буферным раствором (Б) и биоэлюирования растворимым конкурентным лигандом (В) [17].

Инг — иммобилизованный ингибитор; L — конкурентный лиганд.

цианом. Куатреказас и Анфинсен [7] показали, что агароза (наиболее распространенная продажная форма **сефарозы**) обладает почти всеми характеристиками идеального носителя. В 1968 г. Куатреказас и др. [8] успешно применили аффинную хроматографию для выделения нуклеазы, химотрипсина и карбоксипептидазы А и предложили термин «аффинная хроматография». Далее развитие метода шло в основном в направлении его применения для выделения ферментов, их ингибиторов, антител и антигенов, нуклеиновых кислот, транспортных и репрессорных белков, гормонов и их рецепторов и др. (см. табл. 11.1).

Использование аффинной хроматографии тем не менее не ограничивается только выделением биологически активных веществ. Уже в 1960 г. Яги и др. [22] описали определение небольших количеств антител с помощью нерастворимых носителей с привязанными антигенами. Применение нерастворимых носителей в количественном радиоиммунном анализе детально рассмотрено в разд. 11.7. Иммобилизованные олигомеры политимидиловой кислоты использовали Эдмондс и др. [11] для количественного определения полиадениловой кислоты. Аффинная гель-фильтрация как микрометод при экспрессных определениях молекулярных масс

дегидрогеназ основана на исключении последних из гелевой среды с варьируемым размером пор; метод описан Лоу и Дином [16].

По своей сути аффинная хроматография — идеальный метод для изучения взаимодействий в биохимических процессах. Имобилизованная лейцил-тРНК-синтетаза использована как для выделения изолейцил-тРНК, так и для изучения взаимодействия белка с нуклеиновой кислотой [10]. Взаимодействия пептидов с белками [12] и нуклеотидов с аминокислотами и пептидами [20]

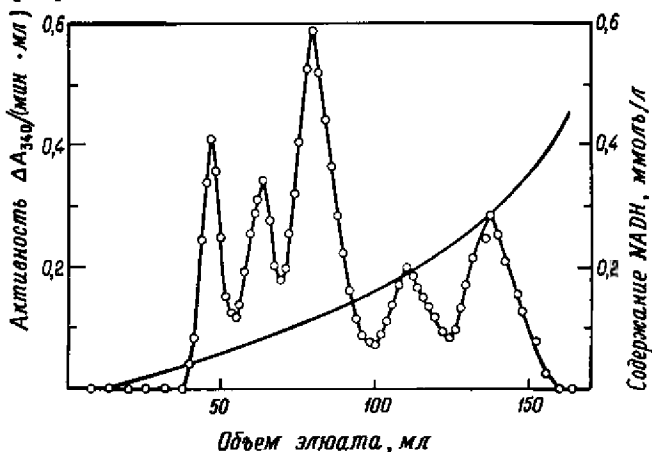


Рис. 2.2. Элюирование изоферментов лактатдегидрогеназы вогнутым градиентом NADH [4].

0,2 мл образца белка (0,2 мг) в растворе, содержащем 0,1 М Na-фосфатный буфер (рН 7,0), 1 мМ β-меркаптоэтанол и 1 М хлорид натрия, нанесены на колонку с сепарозой со связанным аналогом АМР (140X6 мм, содержащую 2,5 г влажного геля), уравновешенную 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 7,5); затем колонка промыта 10 мл используемого буферного раствора, изоферменты элюированы вогнутым градиентом NADH (от 0,0 до 0,3 ммоль/л) в буферном растворе 1 мМ β-меркаптоэтанол. Объем фракции 1 мл; скорость потока 3,4 мл/ч.

также изучены этим методом. Кроме того, метод применен для исследования механизмов ферментативных процессов и выяснения структур молекул. Аканума и сотр. [1] применили его для изучения связывающего участка бычьей карбоксипептидазы В, исследуя комплексообразование с иммобилизованными субстратными аналогами основных и ароматических аминокислот. Используя аффинную хроматографию, Дилени и О'Карра [9] показали, что оксалоацетат ингибирует лактатдегидрогеназу путем образования тройного непродуктивного комплекса с комплексом фермент — NAD^+ , а не с комплексом фермент — NADH, как предполагалось первоначально. Аффинная хроматография оказалась весьма полезной при изучении кинетики активации трипсиногена [14]. Молекулярная структура интерферонов фибробластов и лейкоцитов

человека изучена с помощью аффинной хроматографии Янковским и др. [13].

Для разделения изоферментов лактатдегидрогеназы Броделиус и Мосбах [4] использовали сефарозу с присоединенными аналогами АМР; при элюировании растворами с возрастающей концентрацией NADH получены пять пиков изоферментов (рис. 2.2). Разделение достигается благодаря различиям в константах диссоциации $K_{\text{дисс}}$ двойного комплекса фермент — NADH. Позднее Броделиус и Мосбах [5] аналогичным образом хроматографиро-

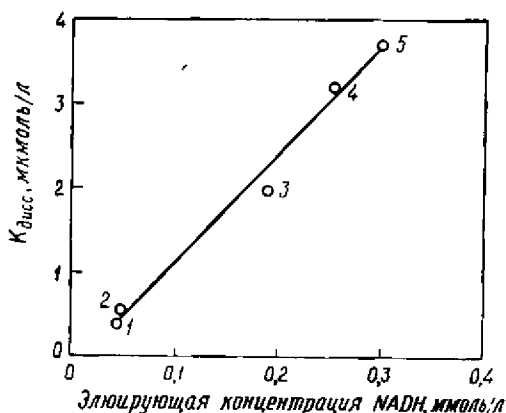


Рис. 2.3. Зависимость константы диссоциации бинарных комплексов фермент — NADH [5].

Лактатдегидрогеназы: 1 — H_4 быка; 2 — H_4 свиньи; 3 — M_4 быка; 4 — M_4 кролика; 5 — M_4 свиньи.

вали ряд лактатдегидрогеназ из различных источников, константы которых известны. Рис. 2.3 иллюстрирует прямую пропорциональность $K_{\text{дисс}}$ от элюирующей концентрации NADH. Линейность указывает, что в данном случае константы диссоциации комплексов фермент — NADH играют более важную роль, чем константы диссоциации комплексов фермента с иммобилизованным аффинным лигандом (АМР). Таким образом, появилась возможность определения констант диссоциации двойных комплексов фермента с NADH; метод основан на установлении элюирующих концентраций NADH. Не обнаружено различий в величинах $K_{\text{дисс}}$ при использовании как кристаллических, так и неочищенных препаратов ферментов. Другие белки, присутствующие в неочищенных препаратах, даже если они связывались колонкой, не влияли на картину элюирования. Это обстоятельство создает огромное преимущество таких определений по сравнению с обычными методами определения констант диссоциации, которые требуют не

только чистых ферментов, но также и гомогенных изоферментов. Другим преимуществом является большая быстрота и расход очень небольших количеств фермента для каждого определения.

Использование аффинной хроматографии для определения, например, констант ингибирования ферментов, по-видимому, весьма перспективно. Данные об объемах элюатов, содержащих фермент, на колонке с иммобилизованным ингибитором, полученные при использовании различных концентраций ингибитора в растворе, позволяют определить константы ингибирования как для связанного ингибитора, так и для ингибитора в растворе. Метод детально рассмотрен в гл. 4. Большое преимущество этого метода состоит в том, что при использовании одного и того же ингибитора как для иммобилизации, так и для элюирования можно непосредственно сделать выводы о влиянии связей с носителем и природы носителя на изучаемое взаимодействие на основании совпадения или различий в определяемых величинах констант диссоциации. Следовательно, метод аффинной хроматографии открывает новые возможности не только для изучения взаимодействия биологически активных веществ, он перспективен также и для выяснения влияния микроокружения на образование этих комплексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Akonuma H., Kasuga A., Akanuma T., Yamasaki M.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 45, 27—33 (1971).
2. *Axén R., Ernback S.*, Eur. J. Biochem., 18, 351—360 (1971).
3. *Axén R., Porath J., Ernback S.*, Nature (London), 214, 1302—1304 (1967).
4. *Brodellus P., Mosbach K.*, FEBS Lett., 35, 223—226 (1973).
5. *Brodellus P., Mosbach K.*, Biochem. Soc. Trans., 2, 1308—1310 (1974).
6. *Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 37, 575—578 (1951).
7. *Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.*, Methods Enzymol., 22, 345—378 (1971).
8. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61, 636—643 (1968).
9. *Delaney M., O'Carra P.*, Biochem. Soc. Trans., 2, 1311 (1974).
10. *Denburg J., De Luca M.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 67, 1057—1062 (1970).
11. *Edmonds M., Vaughan M. H., Hakazato H.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68, 1336—1340 (1971).
12. *Gawronski T. H., Wold F.*, Biochemistry, 11, 442—448 (1972).
13. *Jankowski W. J., Davey M. W., O'Malley J. A., Sulkowski E., Carter W. A., J. Virol.*, 16, 1124—1130 (1975).
14. *Kasche V.*, Arch. Biochem. Biophys., 173, 269—272 (1976).
15. *Lerman L. S.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 39, 232—236 (1953).
16. *Low C. R., Dean P. D. F.*, FEBS Lett., 18, 31—34 (1971).
17. *O'Carra P., Barry S., Griffin T.*, Methods Enzymol., 34, 108—126 (1974).
18. *Porath J., Axén R., Ernback S.*, Nature (London), 215, 1491—1492 (1967).
19. *Reiner R. H., Walch A.*, Chromatographia, 4, 578—587 (1971).
20. *Schott H., Eckstein H., Gatfield I., Bayer E.*, Biochemistry, 14, 5541—5548 (1975).
21. *Starkenstein E.*, Biochem. Z., 24, 210—218 (1910).
22. *Yagi Y., Engel K., Pressman D.*, J. Immunol., 85, 375—386 (1960).

Теория аффинной хроматографии

3.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ, ВЫВЕДЕННЫЕ ИЗ РАССМОТРЕНИЯ РАВНОВЕСНОЙ МОДЕЛИ*

Несмотря на значительное число статей [6, 8, 10, 12—14], в которых эмпирически трактуется большинство варьирующих факторов, влияющих на результаты аффинной хроматографии, теоретические рекомендации, основанные на физико-химических свойствах и закономерностях, очень редки. Наиболее конструктивна разработка Грейвсом и Ву [3] простых кинетических и равновесных моделей аффинной сорбции и десорбции. Анализировалась в отдельности адсорбционная и десорбционная фазы аффинной хроматографии, но в каждой фазе рассматривались в первую очередь ограничения, основанные на равновесных закономерностях, и не принимались во внимание кинетические процессы (диффузия и реакция).

Поскольку существенно легче анализировать результаты сорбции или десорбции в одноразовом процессе, основные закономерности выведены для простой модели, включающей одноразовую сорбцию, промывку и элюирование, в предположении, что равновесие достигается на каждой стадии. При этом в качестве вещества, подлежащего выделению, принимался фермент. Однако те же закономерности безусловно справедливы и для любого другого соединения.

3.1.1. Равновесная модель для сорбции с постоянной константой связывания

Основной предпосылкой для проведения аффинной хроматографии является образование специфического комплекса EL между выделяемым ферментом E и аффинным лигандом L, связанным с нерастворимым носителем. Применимы следующие уравнения:



и

$$K_L = \frac{[E][L]}{[EL]}, \quad (3.2)$$

* Список обозначений см. на стр. 35.

где K_L — константа равновесия взаимодействия лиганд — фермент в ходе сорбции. Туркова и др. [16] исследовали достижение равновесия при сорбции химотрипсина на N-бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланил-NH₂-сфероне в зависимости от pH и ионной силы в одноразовом процессе (рис. 3.1). Видно, что во всех случаях равновесие достигалось в течение ≤ 1 ч. Порат и Кристиан-

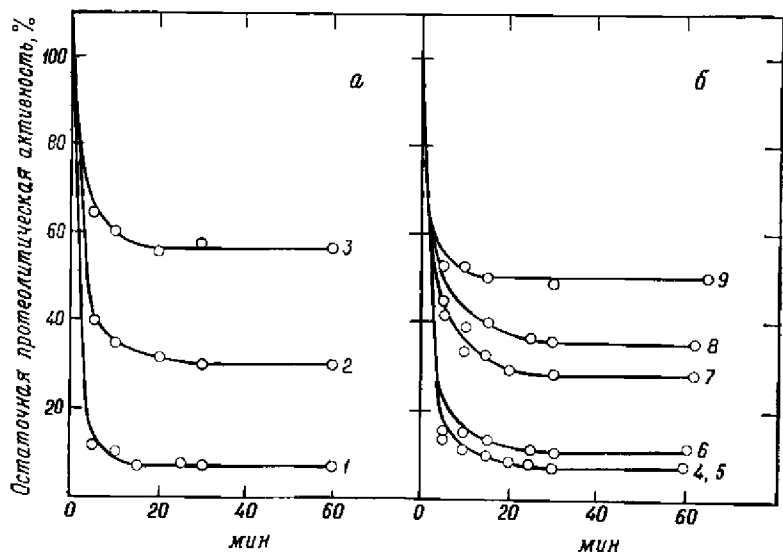


Рис. 3.1. Сорбция химотрипсина Z-Gly-D-Phe-NH₂-сфероном в зависимости от pH (а) и ионной силы трис-HCl-буферного раствора (б) [16].

1 — 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 2 — 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,2); 3 — 0,1 М трис-малеат-буфер (pH 6,0); 4 — 0,05 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 5 — 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 6 — 0,25 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 7 — 0,35 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 8 — 0,5 М трис-HCl-буфер (pH 8,0); 9 — 1 М трис-HCl-буфер (pH 8,0).

сен [13] обнаружили зависимость скорости сорбции трипсина на иммобилизованном ингибиторе трипсина из соевых бобов от концентрации сорбируемого фермента. Это явление детально обсуждается в гл. 10 (рис. 10.4). Лоу и др. [7] сопоставляли количества лактатдегидрогеназы, сорбируемые на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе в колонке и в одноразовом процессе. В то время как в колонке 100%-ное связывание фермента достигается в течение 1 ч, в одноразовом процессе для этого необходимо 16 ч. Результаты одноразового процесса сорбции лактатдегидрогеназы на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе [8] в присутствии различных концентраций конкурентного ингибитора NADH показаны на рис. 3.2. Видно, что при понижении pH, росте ионной силы или

в присутствии конкурентного ингибитора равновесие сдвигается в сторону возрастания концентрации фермента в растворе.

Для того чтобы из уравнения (3.2) вывести другие зависимости, Грейвс и Ву [3] сделали следующие допущения. Объем геля v' включает меньший объем v раствора внутри сетки, построенной полимерными молекулами геля. Перед добавлением раствора фермента концентрация аффинного лиганда, связанного в геле, равна L_0 (в молях на объем v), а концентрация фермента равна

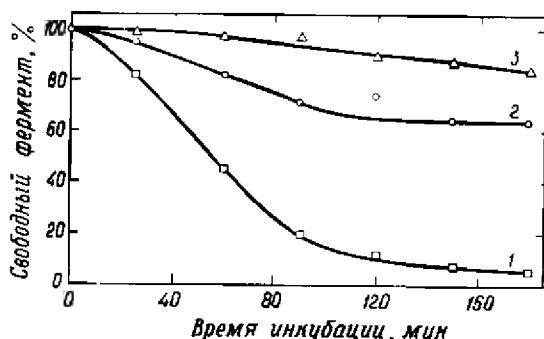


Рис. 3.2. Одноразовый процесс сорбции лактатдегидрогеназы на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозе в присутствии NADH [8].

В стеклянную пробирку (диаметр 14 мм) на плотную марлю (двойной слой, отверстия 100 мкм), закрывающую открытый конец пробирки, помещалось 0,5 г N^6 -(6-аминогексил) 5'-AMP—сефарозы (1,5 мкмоль/мл 5'-AMP). Пробирка погружалась в осторожно перемешиваемый инкубационный раствор (10 мл), из которого через определенные интервалы времени отбирали пробы (по 50 мкл) для определения ферментативной активности. Предварительно проводился диализ фермента в течение ночи против раствора, такого же, как и в эксперименте. Инкубационный раствор на основе 10 мМ фосфатного ($KH_2PO_4 + KOH$) буфера (pH 7,5) содержал: 1 — 0,02% NaN_3 ; 2 — 0,02% $NaN_3 + 2$ мМ NADH; 3 — 0,02% $NaN_3 + 5$ мМ NADH.

нулю. После добавления фермента (объем раствора V , концентрация E_0) система стремится к равновесию. Равновесная концентрация связанного фермента $[EL]$ может быть определена уравнением

$$[EL] = \frac{L_0}{2} [B] (1 - \sqrt{1 - A}), \quad (3.3)$$

где

$$B = \frac{K_L(V + v)}{L_0 v} + \frac{E_0 V}{L_0 v} + 1 \quad (3.4)$$

и

$$A = \frac{4E_0 V}{B^2 L_0 v}. \quad (3.5)$$

Предположив, что $A \ll 1$, соотношение можно упростить:

$$\sqrt{1 - A} \approx 1 - (A/2). \quad (6)$$

Тогда уравнение (3.3) сводится к выражению

$$[EL] \approx \frac{L_0 E_0 V}{K_L (V + v) + L_0 v + E_0 V}. \quad (3.7)$$

Ошибка, возникающая в результате принятого приближения, составляет $\sim 2,6\%$ для $A=0,1$, $\sim 5,2\%$ для $A=0,2$ и $\sim 17,1\%$ для $A=0,5$. Величина B , определяемая уравнением (3.4), обычно близка единице; если допустить, что $B=1$, то из уравнения (3.5) получаем, что A равно учетверенному отношению числа молей фермента к числу молей лиганда. В обычных условиях концентрация фермента в растворе составляет $\leq 10^{-5}$ моль/л, а типичная концентрация лиганда в фазе геля обычно 10^{-2} моль/л. Следовательно, при разумном соотношении объемов раствора V и геля ошибка, вносимая аппроксимацией, весьма мала.

С учетом принятых приближений при достижении равновесия долю связанного фермента (относительно общего количества фермента) можно определить следующим образом:

$$\frac{\text{Связанный фермент}}{\text{Весь фермент}} = \frac{[EL]_v}{E_0 V} \approx \frac{L_0 v}{K_L (V + v) + L_0 v + E_0 V}. \quad (3.8)$$

В большинстве случаев в знаменателе уравнения (3.8) $E_0 V$ много меньше суммы двух других слагаемых и им можно пренебречь.

Уравнение (3.8), следовательно, можно использовать для оценки эффективности связывания при данных параметрах K_L , L_0 , E_0 , V и v . В случае неспецифического включения фермента в гель в дополнение к связыванию фермента с помощью лиганда, сопровождающемуся образованием комплекса, Грейвс и Ву получили следующее выражение:

$$\begin{aligned} \frac{\text{Связанный фермент} + \text{Включенный фермент}}{\text{Весь фермент}} &= \frac{V(E_0 - E)}{VE_0} \approx \\ &\approx \frac{L_0 v}{K_L (V + v) + L_0 v} + \left(\frac{v}{V + v} \right) \left[1 - \frac{L_0 v}{K_L (V + v) + L_0 v} \right]. \end{aligned} \quad (3.9)$$

Это отношение показывает распределение фермента между двумя фазами, а различие между уравнениями (3.9) и (3.8) обусловлено ферментом, включенным в гель дополнительно к комплексу с лигандом.

Из уравнения (3.9) следует

$$\begin{aligned} \frac{\text{Свободный фермент} + \text{Включенный фермент}}{\text{Связанный фермент}} &= \frac{(V + v) E}{(E_0) V - E (V + v)} \approx \\ &\approx \frac{V}{L_0 v} \cdot E_0 + \frac{K_L}{L_0} \left(\frac{V + v}{v} \right). \end{aligned} \quad (3.10)$$

График зависимости левой части уравнения (3.10) от E_0 — прямая. Определив тангенс угла наклона этой прямой $V/(L_0 v)$,

можно найти L_0 . Пересечение прямой с осью ординат дает величину $K_L(V+v)/(L_0v)$, откуда можно найти K_L .

Возвращаясь к уравнению (3.8) и принятым при его выведении приближениям (общее число молей фермента E_0V много меньше общего числа молей лиганда L_0v) и вводя дополнительное

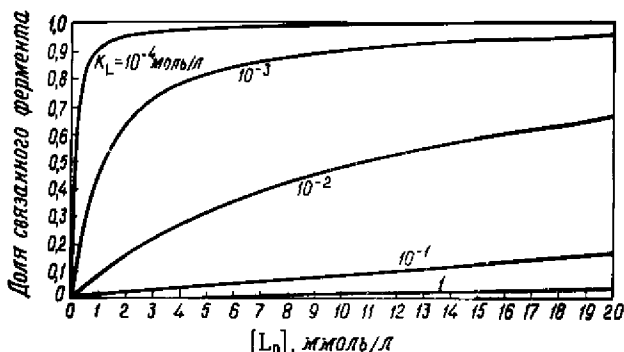


Рис. 3.3. Доля связанного фермента при низких концентрациях фермента, согласно уравнению (3.11). Этот общий гиперболический график может быть также приложен к более точному уравнению (3.8) и даже для оценки доли насыщения лиганда [3].

ограничение $V \ll v$, можно исключить из уравнения E_0 , V и v и получить следующее простое соотношение:

$$\frac{\text{Связанный фермент}}{\text{Весь фермент}} \approx \frac{L_0}{K_L + L_0}. \quad (3.11)$$

Из последнего соотношения видно влияние изменений K_L и L_0 на эффективность связывания фермента; их взаимная зависимость иллюстрируется рис. 3.3. Полученные кривые представляют собой прямоугольные гиперболы, подобные изотермам насыщения Ленгмюра или уравнению Михаэлиса — Ментен. Из рис. 3.3, например, следует, что при обычной концентрации лиганда (10 ммоль/л) достаточно эффективное связывание фермента происходит при $K_L \leq 10^{-3}$ моль/л, в то время как при более высоких значениях K_L фермент удерживается плохо. К подобным же выводам пришли также, например, Стирс и др. [15] на основании экспериментальных результатов. Однако следует подчеркнуть, что рассматривается комплекс фермента с лигандом, ковалентно связанным с нерастворимым носителем, поэтому значения K_L не обязательно согласуются с величинами констант равновесия, определенными в растворе.

На рис. 3.4 приведена зависимость количеств связанной лактатдегидрогеназы из скелетных мышц кролика и мышц сердца свиньи и глицерокиназы от концентрации N⁶-(6-аминогексил)-5'-

АМР на сефарозе [4]. Связаны ли наблюдаемые различия в ходе этих кривых с различиями констант равновесия для образований индивидуальных комплексов, к сожалению, не известно автору этой книги; однако, судя по концентрациям растворов хлорида калия, необходимых для элюирования каждого фермента с упомянутого нуклеотидного носителя, связывание глицерокиназы слабее лактатдегидрогеназ (табл. 4.2).

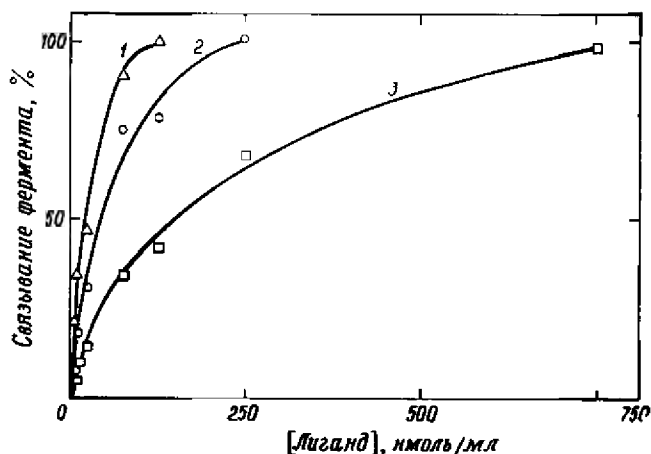


Рис. 3.4. Емкость сорбента с иммобилизованным нуклеотидом (N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефароза) в зависимости от концентрации лиганда [4].

Образец (100 мкл) фермента (5 Е) и бычьего сывороточного альбумина (1.5 мг) наносили на колонку (50×5 мм), содержащую 1.0 г аффинного сорбента, разбавленного до необходимой концентрации лиганда сефарозой 4В. 1 — лактатдегидрогеназа из скелетных мышц кролика; 2 — лактатдегидрогеназа из мышц сердца свиньи; 3 — глицерокиназа.

Доля общего количества лигандных групп, которые в данных условиях насыщаются молекулами фермента, выражается отношением EL/L_0 , которое может быть получено, если обе части уравнения (3.7) разделить на L_0 . Если на рис. 3.3 L_0 по оси абсцисс заменить на E_0V , а вместо K_L в качестве переменного параметра использовать выражение $K_L(V+v) + L_0v$, то отношение EL/L_0 опеределяет ординату.

В табл. 3.1 приведен процент насыщения лиганда молекулами фермента для различных значений ω ($\omega = V/v$) в предположении, что $L_0 = 0.01$ моль/л. Насыщение молекул лиганда ферментом очень низко. Следовательно, при хроматографии на аффинном сорбенте можно ожидать, что фермент начнет вытекать из колонки значительно раньше насыщения реактивных групп геля. Истинная емкость аффинного сорбента далека от соответствия количеству лиганда, связанного с гелем, которое может быть определено, на-

Таблица 3.1

Процент насыщения аффинного лиганда в различных условиях
($L_0 = 0,01$ моль/л)

E_0 , моль/л	K_L , моль/л	EL/L_0 , %		
		$\omega = 1$	$\omega = 10$	$\omega = 100$
10^{-4}	10^{-3}	0,8264	4,5455	8,2645
	10^{-4}	0,9709	8,2645	33,2226
	10^{-5}	0,9881	9,0009	47,5964
	10^{-6}	0,9899	9,0818	49,7488
10^{-5}	10^{-3}	0,0833	0,4739	0,8929
	10^{-4}	0,0979	0,8929	4,7393
	10^{-5}	0,0997	0,9794	8,3264
	10^{-6}	0,0999	0,9890	9,0082
10^{-6}	10^{-3}	0,0083	0,0476	0,0900
	10^{-4}	0,0098	0,0900	0,4950
	10^{-5}	0,0100	0,0988	0,9001
	10^{-6}	0,0100	0,0998	0,9803
10^{-7}	10^{-3}	0,0008	0,0048	0,0090
	10^{-4}	0,0010	0,0090	0,0497
	10^{-5}	0,0010	0,0099	0,0907
	10^{-6}	0,0010	0,0100	0,0989

пример, в случае белка или пептида по данным количественного аминокислотного анализа гидролизата. Туркова и сотр. [16], например, нашли, что только 0,3% молекул N-бензилоксикарбонил-глицил-D-фенилаланина, связанного с NH_2 -сфероном, насыщается химотрипсином. Лоу и др. [8] нашли, что для связывания лактатдегидрогеназы N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозой емкость сорбента составляет 0,76% при одноразовом процессе и менее 0,1% при фронтальном хроматографическом анализе. Подобным образом, Гиеровский и Бродерсен [5] определили, что в данных экспериментальных условиях лишь $\sim 1/10$ молекул билирубина на носителе способны связывать сывороточный альбумин.

3.1.2. Равновесная модель для элюирования путем изменения K_L .

Как указывалось в гл. 2 (рис. 2.1), специфически сорбированный выделяемый фермент может быть освобожден из комплекса с пришитым аффинным лигандом либо при помощи раствора конкурентного ингибитора (биоспецифическое элюирование), либо при изменении среды. Последний метод является более общим: как правило, меняют pH или ионную силу раствора. Хотя влияния таких изменений могут иметь сложный характер, Грейвс и Ву [3], выводя закономерности для освобождения фермента с аффинного

сорбента, сделали следующие упрощающие допущения: изменение ионного окружения приводит только к увеличению K_L . Одноразовый процесс можно разделить на шесть стадий: 1) гель объемом v уравнивается с ферментом объемом V (константа равновесия K_L); 2) V отделяется от v ; 3) к v прибавляется объем (неэлюирующего) промывного раствора (w), устанавливается новое равновесие (K_L не изменяется); 4) w отделяется от v , при этом удаляются белки-примеси, которые сорбировались в геле (также частично теряется фермент, как связанный, так и включенный); 4а) третья и четвертая стадии повторяются, если необходимо довести количество примесей до низкого уровня; 5) к v прибавляется объем V' элюента и устанавливается новое равновесие с более высокой константой K'_L ; 6) V' отделяется от v и при этом получают чистый фермент. Чтобы повысить выход фермента, можно повторить пятую и шестую стадии, однако на практике элюирование не повторяется несколько раз.

Элюирование фермента без стадии промывки

Вывод соотношений, описывающих процесс элюирования, аналогичен выводу для процессов адсорбции. Однако, поскольку процесс элюирования более сложный, Грейвс и Ву исходили лишь из приближения (3.6).

Из уравнения (3.9) найдено выражение для суммарного количества фермента, оставшегося в V , содержащегося в V' и включенного в v :

$$\frac{\text{Включенный фермент} + \text{Фермент в } V \text{ и } V'}{\text{Весь фермент}} \approx 1 - \frac{L_0 v (K_L v + L_0 v)}{[K_L (V + v) + L_0 v] [K'_L (V' + v) + L_0 v]}. \quad (3.12)$$

Для фракции фермента, содержащейся в элюате аффинного сорбента, предложено следующее выражение:

$$\frac{\text{Фермент в } V'}{\text{Весь фермент}} \approx \left(\frac{V'}{V' + v} \right) \left\{ 1 - \frac{L_0 v (K_L v + L_0 v)}{[K_L (V + v) + L_0 v] [K'_L (V' + v) + L_0 v]} - \left(\frac{V}{V + v} \right) \left[1 - \frac{L_0 v}{K_L (V + v) + L_0 v} \right] \right\}. \quad (3.13)$$

Этот вывод полезен для понимания всего процесса. Заслуживает внимания то, что выход фермента в значительной степени зависит от отношения V'/v и менее зависим от V/v . Уравнение (3.13) для выхода фермента графически выражается в асимптотическом приближении к пределу (рис. 3.5, а), даже для фермента с очень высокими значениями K'_L . Из графика следует, что неблагоприятны

ми для выделения являются $K_L > 10^{-3}$ моль/л, однако трудности возникают и при слишком низких значениях K_L , поскольку часть фермента может при этом оставаться в гелевой фазе и после элюирования. Более того, из рис. 3.5, а ясно, что при значительном различии между величинами K_L и K'_L выделение фермента происходит более легко. На рис. 3.5, а приведен также фактор очистки

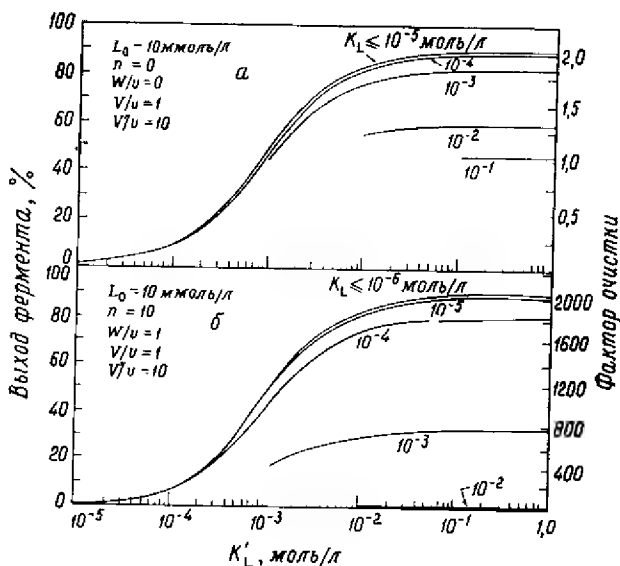


Рис. 3.5. Выход фермента и фактор очистки без стадий промывки для отношения объема образца к объему геля 1:1 (а), и при 10-кратной промывке для отношения объема элюирующего раствора к объему геля 10:1 (б) [3].

(P_f), который определяется как отношение выделенного фермента к общему количеству белка, деленное на исходное отношение фермент — белок. При освобождении фермента с аффинного сорбента, не включающем стадию промывки, P_f очень низок. Очевидно, что без стадий промывок очистка не эффективна, даже с благоприятно низкими величинами K_L и достаточно высокими величинами K'_L , поскольку полученный фермент загрязняется белками.

Оценка эффективности промывок, приводящих к уменьшению примесей, проста:

$$\frac{\text{Примесный белок в элюате}}{\text{Весь примесный белок}} = \left[\frac{vV'}{(V+v)(V'+v)} \right] \left[\frac{v}{\omega+v} \right]^n. \quad (3.14)$$

Лучше промывать несколько раз небольшими объемами, чем один раз большим. Это уравнение указывает также на преимуще-

ство колоночной хроматографии: постепенное пропускание элюента через колонку равносильно элюированию с большим числом промывок (n).

Элюирование фермента после нескольких промывок

Определение выхода фермента осложняется тем, что он связан с лигандом и в то же время физически включен в объем геля. Для расчета суммарного количества фермента, остающегося связанным после n промывок, Грейвс и Ву [3] получили выражение:

$$\frac{\text{Связанный фермент}}{\text{Весь фермент}} = f_{Bn} \approx \frac{L_0 v (K_L v + L_0 v)^n}{[K_L (V + v) + L_0 v] [K_L (w + v) + L_0 v]^n}. \quad (3.15)$$

Для фракции фермента, остающейся связанной после стадии элюирования, выведено уравнение:

$$f_{BE} \approx \frac{L_0 v (K_L v + L_0 v)^{n+1}}{[K_L (V + v) + L_0 v] [K_L (V' + v) + L_0 v] [K_L (w + v) + L_0 v]^n}. \quad (3.16)$$

Исходя из уравнений (3.8) и (3.12), было получено выражение для количества фермента, содержащегося в элюате:

$$\frac{\text{Выделенный фермент}}{\text{Весь фермент}} = f_R \approx \left(\frac{V'}{V' + v} \right) \left(1 - f_{BE} - \sum_{i=0}^n f_i \right), \quad (3.17)$$

где f_i — фракция фермента (отнесенная к его исходному количеству), которая теряется с отбрасываемым объемом V . Фракции f_i выражаются через относительно простые соотношения:

$$f_0 \approx \left(\frac{V}{V + v} \right) \left(1 - \frac{L_0 v}{K_L (V + v) + L_0 v} \right), \quad (3.18)$$

$$f_1 \approx \left(\frac{w}{w + v} \right) (1 - f_{B1} - f_0), \quad (3.19)$$

$$f_n \approx \frac{w}{w + v} \left(1 - f_{Bn} - \sum_{i=0}^{n-1} f_i \right). \quad (3.20)$$

Выражение для каждой последующей фракции постепенно усложняется, поскольку в нее входит предыдущее уравнение. Следовательно, для отнесенной к исходному количеству фермента фракций f_n , которая теряется в отбрасываемых после n промывок объемах w , справедливо следующее уравнение:

$$f_n \approx \frac{w}{w + v} \left\{ 1 - f_{Bn} + (1 - f_0) \left[\sum_{i=0}^{n-1} \frac{(n-1)!}{(n-1-i)!i!} \left(\frac{-w}{w+v} \right)^i - \right. \right. \\ \left. \left. - \sum_{i=1}^{n-1} f_{Bi} \left[\sum_{j=0}^{n-1-i} \frac{(n-1-i)!}{(n-1-i-j)!j!} \left(\frac{-w}{w+v} \right)^{j+1} \right] \right] \right\}. \quad (3.21)$$

С увеличением числа промывок фактор очистки P_f также значительно возрастает. Например, если каждая единичная промывка имеет относительно большой объем ($\omega/v=10$), P_f возрастает с 2 до 22. Уменьшение процента выхода фермента при этом зависит также от K_L . Например, для $K_L=10^{-5}$ моль/л выход фермента снижается незначительно, но для $K_L=10^{-4}$ моль/л выход при высоких величинах K'_L уменьшается с 90 до 82%, а для $K_L=10^{-3}$ моль/л он понижается уже с 83 до 44%. На рис. 3.5, б показана зависимость процента выхода фермента от K'_L после 10-кратной промывки при $\omega/v=1$. Для $K_L=10^{-5}$ моль/л достигается очень высокая степень очистки ($P_f=2000$) при относительно большом выходе фермента.

3.1.3. Равновесная модель для элюирования конкурентным ингибитором

Другим наиболее часто применяемым методом освобождения фермента из его комплекса со связанным лигандом является элюирование фермента раствором конкурентного ингибитора. При этом основное требование состоит в сохранении значения K_L в ходе процесса элюирования. Уравнения (3.1) и (3.2), описывающие равновесие между ферментом и связанным аффинным лигандом, необходимо дополнить:



и

$$K_I = \frac{k_{-2}}{k_2} = \frac{[E][I]}{[EI]}. \quad (3.23)$$

Последние уравнения относятся к образованию комплекса между ферментом и растворимым ингибитором. Все используемые далее символы имеют те же значения, что и раньше, однако V' теперь означает объем раствора ингибитора. Кроме того, вводятся новые обозначения: I_0 — начальная концентрация ингибитора, $[I]$ — конечная концентрация ингибитора, $[EI]$ — равновесная концентрация фермента, находящегося в комплексе в растворе, и vE_L — число молей фермента, присутствующего в геле до добавления раствора ингибитора. Более того, полученные ранее соотношения, характеризующие эффективность промывок, можно применить также при анализе данного метода элюирования.

Для связанного и включенного в гель (остающегося в геле после n промывок) фермента справедливо следующее выражение:

$$\frac{vE_L}{VE_0} \approx \left(\frac{v}{\omega + v} \right) \left(1 - f_{Bn} - \sum_{i=0}^{n-1} f_i \right) + f_{Bn}, \quad (3.24)$$

где $f_{\text{вн}}$ может быть получено из уравнения (3.15), а f_i — из уравнения (3.18) через уравнения (3.20) и (3.21).

Комбинируя уравнения (3.2) и (3.23) и используя уравнение материального баланса, Грейвс и Ву [3] сделали возможные упрощения и вывели для равновесной концентрации комплекса фермента с растворимым ингибитором следующее выражение:

$$[E] \approx \frac{vV'I_0E_L}{v(V'+v)(2-K_I/K_L)E_L + V'(V'+v)I_0 + K_I(V'+v)^2 + K_IL_0v(V'+v)/K_L}. \quad (3.25)$$

Логически следует (и даже может быть доказано), что в присутствии двух ингибиторов, одного в растворе, а другого в виде иммобилизованного аффинного лиганда, в равновесии находится только небольшое количество свободного фермента $[E]$, хотя общее содержание фермента в растворе может быть значительным (в виде $[E]$). В большинстве случаев общее количество фермента в растворе можно без большой ошибки выразить как $V'[E]$ вместо $V'([E] + [E])$. При таком упрощении, используя уравнение (3.25), а также введя $\rho = V'/v$, Грейвс и Ву вывели следующее уравнение для доли полученного фермента:

$$\frac{\text{Выделенный фермент}}{\text{Весь фермент в промытом геле}} = \frac{V'[E]}{vE_L} \approx \left(\frac{\rho}{\rho+1} \right) \left[\frac{\rho I_0}{2E_L + \rho I_0 + K_I(1+\rho) + \frac{K_I}{K_L}(L_0 - E_L)} \right]. \quad (3.26)$$

Как показано ранее, обычно $L_0 \gg E_L$ и, следовательно,

$$\frac{V'[E]}{vE_L} \approx \left(\frac{\rho}{\rho+1} \right) \left[\frac{\rho I_0}{\rho I_0 + K_I(1+\rho + L_0/K_L)} \right]. \quad (3.27)$$

Для упрощения уравнения (3.27) полезно рассмотреть в качестве первого приближения случай, когда $L_0/K_L \gg \rho$, и членом $K_I(1+\rho)$ поэтому можно пренебречь. В реальных случаях наибольшие значения для ρ равны ~ 10 (более высокие значения соответствуют излишнему разбавлению выделяемого фермента). Если пренебречь членом $(1+\rho)$, то при $K_L = 10^{-3}$ моль/л ошибка составит $\sim 10\%$, а при более низких K_L она много ниже. Следовательно, вместо K_I и K_L можно рассматривать только их отношение:

$$\frac{V'[E]}{vE_L} = \left(\frac{\rho}{\rho+1} \right) \left[\frac{\rho I_0}{\rho I_0 + K_IL_0/K_L} \right]. \quad (3.28)$$

Рис. 3.6 является графической иллюстрацией уравнения (3.28) при $L_0 = 10$ ммоль/л и $\rho = 1$ и 10. Очень важный параметр здесь — отношение констант равновесия для свободного и связанного инги-

битора K_I/K_L . Если это отношение равно единице, концентрация ингибитора в элюенте, необходимая для эффективного элюирования фермента, должна быть равной 10–100 ммоль/л (предполагается, что концентрация лиганда в геле всегда 10 ммоль/л). Концентрация ингибитора и отношение K_I/K_L — взаимозависимые величины. Если растворимый ингибитор связывается в 10 раз сильнее, чем лиганд, то его необходимая концентрация в растворе понижается примерно на порядок, если же он связывается в 10 раз

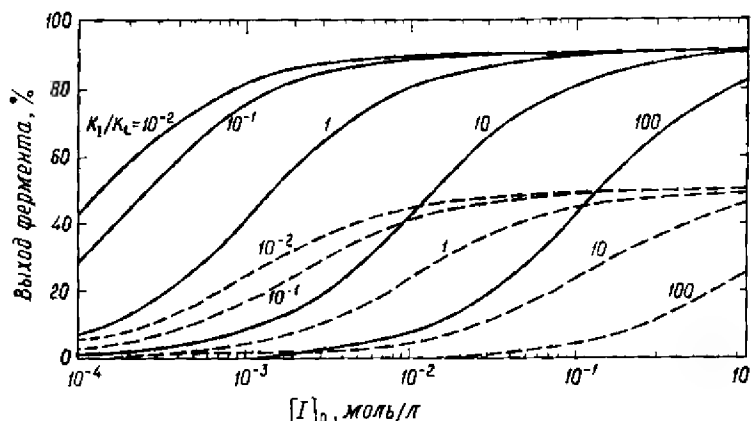


Рис. 3.6. Выход фермента при элюировании растворимым ингибитором [3]. Сплошные линии — $V' : v = 10$, пунктирные — $V' : v = 1$. Без стадий промывки. Соотношение объемов элюирования сильно влияет на общий выход фермента, который может быть достигнут.

слабее, то необходимая концентрация растворимого ингибитора становится равной 0,1–1 моль/л. На элюировании фермента с аффинного сорбента растворами растворимого ингибитора в различных концентрациях основан наиболее распространенный в настоящее время метод определения констант равновесия выделяемого со связанного ингибитора фермента. Практические примеры применения этого метода детально рассмотрены в гл. 4.

3.1.4. Математическое моделирование результатов колоночной хроматографии

Сорбция, промывка и элюирование ферментов с использованием колоночной аффинной хроматографии описываются с помощью уравнений, выведенных для модели одnorазовой сорбции и элюирования путем изменения K_L (рис. 3.7). Из рис. 3.7, а хорошо видно, что при $K_L = 10^{-3}$ моль/л значительная потеря фермента (61,6%) происходит при промывках. Элюирование при K_L , равных

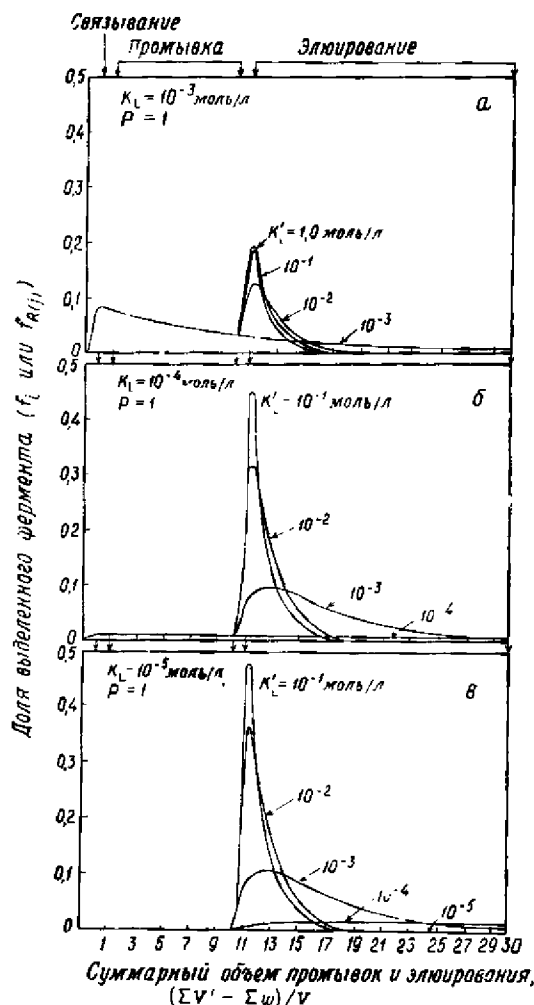


Рис. 3.7. Математическое моделирование результатов колоночной хроматографии [3].

а — плохое связывание ($K_L = 10^{-3}$ моль/л); элюирование осуществляется в результате изменения K_L на K'_L ; существенная потеря фермента происходит при промывках; б — хорошее связывание ($K_L = 10^{-4}$ моль/л); при промывках теряется мало фермента; в — очень хорошее связывание ($K_L < 10^{-5}$ моль/л); фермент практически не теряется при промывках.

1,0, 0,1 и 0,01 моль/л, освобождает весь сорбированный фермент (38,4%). На рис. 3.7, б можно видеть совершенно другое поведение фермента: при выделении фермента с $K_L = 10^{-4}$ моль/л на стадии промывок теряется только 10,3%. При K'_L , равных 0,1 или

0,01 моль/л, можно получить до 89,7% фермента. При $K'_L = 10^{-3}$ моль/л выход составляет $\sim 86,2\%$, а при $K'_L = 10^{-4}$ моль/л — только 16%. На рис. 3.7, в показан очень благоприятный случай при $K_L \leq 10^{-5}$ моль/л, когда, по-видимому, во время промывки никакой потери фермента не происходит. Элюирование при значениях K'_L от 10^{-1} до 10^{-5} моль/л дает выходы (от исходного количества фермента) 98,9, 98,9, 95,6, 29,7 и 1,9% после 20 промывок. Высокие значения K'_L являются желательными, поскольку при этом получают более концентрированные растворы фермента на выходе.

3.1.5. Заключение

Хотя многие выведенные соотношения должны быть уточнены экспериментально, они уже сегодня полезны, поскольку указывают на аспекты, требующие от исследователя внимания. Аффинный сорбент с концентрацией связанного лиганда ~ 10 ммоль/л следует использовать только для выделения веществ, константы равновесия которых (с закрепленным аффинантом) $\leq 10^{-3}$ моль/л. Для систем с более высокими (менее благоприятными) константами равновесия следует использовать сорбенты с соответственно более высоким содержанием связанного аффинного лиганда. Однако на практике этому случаю сопутствуют многочисленные ограничения, которые рассматриваются в гл. 5.

Другим важным следствием рассмотренных выше соотношений является низкое насыщение молекул иммобилизованного лиганда выделяемым веществом. Для повышения этого насыщения необходимо проводить сорбцию из как можно более высоко концентрированного раствора. Низкие проценты насыщения, получаемые на практике, следует объяснять не только стерическими факторами, но также и ограничениями равновесного характера.

Из взаимосвязи между промывками и элюированием путем изменения K_L следуют два важных факта. При $K_L \leq 10^{-5}$ моль/л одноразовая сорбция и элюирование могут привести к тем же, а иногда и лучшим результатам по сравнению с колоночной хроматографией. При $K_L = 10^{-3}$ моль/л только при применении колоночной хроматографии можно получить хорошие результаты. Кроме того, для эффективного удаления фермента из геля K'_L на стадии элюирования должна достичь значения по крайней мере 10^{-2} моль/л независимо от K_L . Необходимость достижения столь высоких величин иногда ограничивает использование аффинантов со слишком низкими K_L . Число промывок и объем каждой промывки являются решающими для удаления загрязнений, и поэтому стадия промывки сильно влияет на фактор очистки. При $K_L < 10^{-4}$ моль/л потери незначительны, даже когда промывка проводится большими объемами.

Для элюирования раствором ингибитора наиболее важным параметром является отношение равновесных констант K_I/K_L : чем меньше это отношение, тем ниже может быть концентрация растворимого ингибитора, необходимая для элюирования.

Основные соотношения, полученные для одноразового метода аффинной хроматографии, применимы также и для колоночной хроматографии.

Список используемых обозначений

- A — параметр, определяемый уравнением (3.5)
- B — параметр, определяемый уравнением (3.4)
- $[E]$ — равновесная концентрация фермента
- E_L — кажущаяся концентрация фермента (фермента, связанного с лигандом и включенного в гель) после промывки перед элюированием [см. уравнение (3.24)]
- E_0 — начальная концентрация фермента в фазе раствора перед контактом с фазой геля
- $[EL]$ — равновесная концентрация комплекса фермент — лиганд
- f_{BE} — фракция фермента (отнесенная к его исходному количеству), остающаяся связанной с лигандом после n промывок и одного элюирования
- f_{Bn} — фракция фермента (отнесенная к его исходному количеству), остающаяся связанной с лигандом после n промывок
- f_n — фракция фермента (отнесенная к его исходному количеству), теряющаяся в отбрасываемых после n промывок объемах w
- f_0 — фракция фермента (отнесенная к исходному количеству), теряющаяся с отбрасываемым объемом V
- f_R — фракция фермента (отнесенная к исходному количеству), содержащаяся в объеме V' после n промывок и одного элюирования
- $f_{R(m)}$ — фракция фермента (отнесенная к исходному количеству), содержащаяся в объеме V' элюата после m стадий элюирования и n промывок
- I_0 — исходная концентрация ингибитора
- K_L — константа равновесия взаимодействия лиганд — фермент на стадиях сорбции [определяется уравнением (3.2)]
- K'_L — константа равновесия лиганд — фермент в ходе элюирования
- K_I — константа равновесия диссоциации комплекса фермент — растворимый ингибитор

- k_1 — константа скорости комплексообразования фермента с лигандом
 k_{-1} — константа скорости диссоциации комплекса фермент — лиганд
 k_2 — константа скорости комплексообразования фермента с растворимым ингибитором
 k_{-2} — константа скорости диссоциации комплекса фермент — растворимый ингибитор
 $[L]$ — равновесная концентрация лиганда
 L_0 — начальная концентрация лиганда в геле
 m — число операций элюирования
 n — число промывок
 P_f — фактор очистки (отношение относительного содержания выделенного фермента в белке к такой же величине в исходном растворе)
 R — фракция выделенного фермента, определяемая уравнениями (3.27) или (3.28)
 v — объем фазы геля, доступной для проникновения молекул белка
 v' — истинный объем фазы геля
 V — начальный объем раствора фермента, добавляемого к гелю
 V' — объем элюента
 w — объем промывного раствора
 ρ — отношение V'/v
 ω — отношение V/v

3.2 ТЕОРИЯ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ В РАМКАХ ТЕОРИИ ТАРЕЛОК*

Вывод уравнений и моделирование кривых элюирования проведены Окадой и др. [11] на основании данных кооперативного элюирования олигодениловой кислоты с агарозы с присоединенной полиуридилловой кислотой.

3.2.1. Изотерма связывания олигодениловой кислоты с полиуридилловой кислотой

Содержание спиральной структуры в полиуридилловой кислоте можно выразить с помощью следующего уравнения [1]:

$$\theta_a = Nc/c_{uf}'(c) \quad (3.29)$$

* Список обозначений см. на стр. 42.

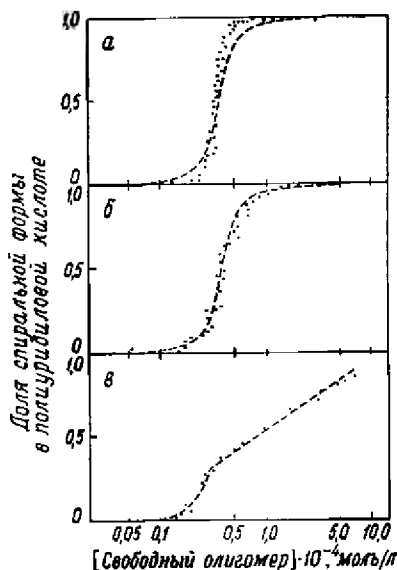
или

$$c = \bar{c} + c_u / N \theta_u \quad (3.30)$$

Найдено, что привязка полиуридилевой кислоты к агарозе происходит по 5'-концу. Согласно этому, а также принимая во внимание другие данные, по-видимому, можно предположить, что им-

Рис. 3.8. Изотерма комплексообразования полиуридилевой кислоты с олигоадениловой кислотой при 5°C, pH 7,0 в 0,033 М фосфатном буфере, содержащем 1 моль/л NaCl и 1 ммоль/л MgCl₂.

a — в растворе; концентрация полиуридилевой кислоты $3,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л; *б* — в геле после промывки раствором с pH 10,0; концентрация полиуридилевой кислоты $4,9 \times 10^{-4}$ моль/л; *в* — в геле до промывки раствором с pH 10,0; концентрация полиуридилевой кислоты $1,2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Пунктирная кривая построена теоретически. Ордината указывает долю спиральной формы полиуридилевой кислоты при стехиометрическом соотношении адениловая кислота:уридиловая кислота = 1:2.



мобилизованная полиуридилевая кислота имеет ту же конформацию, что и в растворе, и поэтому функцию разделения системы можно рассчитать обычным способом, если полагать для несвязанного олигомера и незанятого участка связывания на аффинном сорбенте функцию разделения равной единице. Если $c_u \gg c$, перекрыванием двух связанных олигомеров можно пренебречь. Окада и др. [11] ограничили анализ короткими олигомерами и предположили осуществление связывания олигомера с полиуридилевой кислотой по типу «все или ничего».

В этих условиях функция разделения системы задается N -й степенью наименьшего корня ρ векового уравнения [1, 9]

$$(1-x)(1-x^N s_1) - s_1 x^{N+1} = 0. \quad (3.31)$$

Когда концентрация свободного олигомера забуферена, содержание спиральной формы полиуридилевой кислоты выражается следующим образом:

$$\theta_u = \frac{N}{\chi s^N \bar{c} \rho^N \{ \text{ор} (2 - \rho) / (1 - \rho)^2 \} + 1} + N - 1 \quad (3.32)$$

Из уравнения (3.31) имеем

$$\bar{c} = \frac{1}{\chi s^N \rho^N} \cdot \frac{1 - \rho}{1 - \rho + \sigma \rho}, \quad (3.33)$$

а из уравнений (3.30) и (3.32)

$$c = \bar{c} + c_a \frac{(1 - \rho)(1 - \rho + \sigma \rho)}{\sigma \rho + N(1 - \rho)(1 - \rho + \sigma \rho)}. \quad (3.34)$$

Изотерму связывания можно получить из уравнений (3.33) и (3.34). Параметры χs^2 и σ в уравнениях определяются соответственно из концентрации свободного олигомера и тангенса угла наклона в точке перегиба экспериментальной изотермы связывания. Смоделированная таким образом изотерма связывания ($N = 2$, $\chi s^2 = 1,1 \cdot 10^5$ моль/л, $\sigma = 0,017$) показана пунктирной линией на рис. 3.8.

3.2.2. Кооперативная адсорбционная колоночная хроматография

На рис. 3.9 показаны типичные кривые элюирования олигоадениловой кислоты при различных температурах. При понижении температуры от 15 до 0°C максимум кривых элюирования смеща-

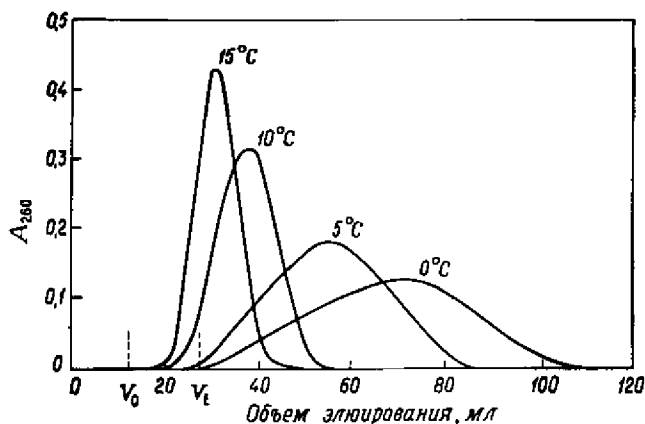


Рис. 3.9. Температурная зависимость элюирования олигоадениловой кислоты с иммобилизованной полиуридиловой кислоты [11].

Состав элюирующего буферного раствора: $1/30$ М фосфатный буфер + 1 М NaCl + 1 мМ $MgCl_2$ (pH 7,0); концентрация нанесенной олигоадениловой кислоты $4,9 \cdot 10^{-3}$ моль/л; объем фракций 0,1 мл; концентрация полиуридиловой кислоты $0,98 \cdot 10^{-3}$ моль/л; V_0 — свободный объем, V_t — объем колонки.

ется и форма кривой уже отклоняется от распределения Гаусса. Отсюда следует, что при охлаждении связывание олигоадениловой кислоты с полиуридиловой кислотой стабилизируется. Более того,

искажение кривых элюирования указывает на кооперативность связывания.

Изотерма связывания показывает, что связывание олигодениловой кислоты происходит кооперативно и поэтому наблюдаемая константа диссоциации не постоянна. В соответствии с типом связывания кривые элюирования, полученные при 5 и 10°C и различных концентрациях олигодениловой кислоты, изменяются, как показано на рис. 3.10. С другой стороны, известно, что при некооперативном связывании кривая элюирования сохраняет форму гауссовой, максимум которой не зависит от концентрации. Применяя теорию тарелок, Окада и др. [11] изучили кооперативную адсорбционную хроматографию, пренебрегая эффектом гель-фильтрации, поскольку олигомеры очень малы по сравнению с размером пор геля. Первое условие состоит в том, что концентрация свободного олигомера должна быть одинаковой в подвижной фазе и фазе геля. Общая концентрация c_k^t олигомера на k -тарелке выражается, следовательно, через концентрацию свободного олигомера $\bar{c}_k$ и концентрацию связанного олигомера c_k^b :

$$c_k^t = \bar{c}_k + qc_k^b, \quad (3.35)$$

где q — доля объема, относящаяся к фазе геля. Второе условие состоит в том, что равновесие связывания должно достигаться достаточно быстро, чтобы устанавливаться на каждой тарелке. Таким образом, используя уравнения (3.33) и (3.34), можно найти зависимость между c_k^b и c_k^t :

$$qc_k^b = f(c_k^t) c_k^t, \quad (3.36)$$

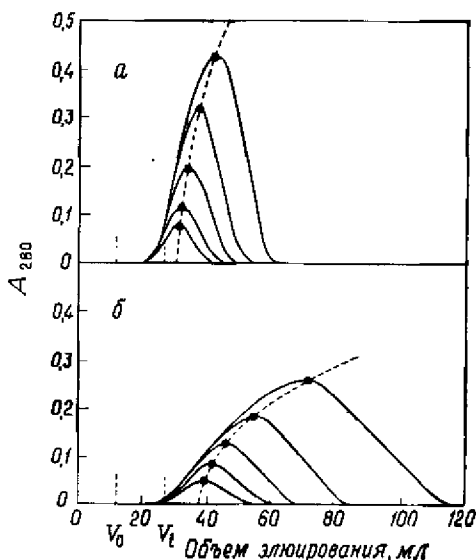


Рис. 3.10. Концентрационная зависимость элюирования олигодениловой кислоты с иммобилизованной полиуридилловой кислоты [11].

Концентрация нанесенной олигодениловой кислоты: $9,8 \cdot 10^{-3}$, $4,9 \cdot 10^{-3}$, $2,5 \cdot 10^{-3}$, $1,2 \cdot 10^{-3}$, $0,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л; объем фракции 0,1 мл; температура (°C): $a - 10$, $b - 5$; V_0 — свободный объем, V_t — объем колонки.

где f получается из f' путем замены c_u на qc_u . Таким образом, на следующей стадии элюирования олигомеры в количестве $c_k V$ двигаются к $(k+1)$ -тарелке, а $qc_k^b V$ олигомеров остается на k -тарелке (где V — объем тарелки с вычетом объема геля). Исходя из коэффициента $f(c_k^t)$, определяющего долю олигомеров, которая остается в следующей стадии элюирования, уравнение колонки с общей концентрацией в качестве независимой переменной можно записать в виде следующего выражения:

$$c_k^t(i) = c_k^t(i-1) f[c_k^t(i-1)] + c_{k-1}^t(i-1) \{1 - f[c_{k-1}^t(i-1)]\} \quad (1 \leq k \leq i), \quad (3.37a)$$

$$c_0^t(i) = c_0^t(i-1) f[c_0^t(i-1)], \quad (3.37b)$$

где i — номер стадии (т. е. параметр времени).

Если общее число тарелок равно $(k_m - 1)$, кривая элюирования дается функцией $\bar{c}k_m(i)$ с начальными условиями:

$$c_k^t(0) = 0, \quad k_m \geq k \geq 1, \quad (3.38a)$$

$$c_0^t(0) = c_0. \quad (3.38b)$$

Кривые элюирования, полученные математическим моделированием на вычислительной машине с использованием уравнений (3.37a) и (3.37b), хорошо согласуются с экспериментальными результатами и показаны на рис. 3.10. Изотерма связывания, использованная в этом расчете, была выведена из уравнений (3.33) и (3.34), поскольку их параметры лучше соответствуют экспериментальной кривой для равновесного диализа (рис. 3.8).

3.2.3. Характерные особенности кооперативных адсорбционных хроматограмм

Для того чтобы найти общие характеристики нелинейных адсорбционных хроматограмм, перепишем уравнение (3.37) в форме уравнения в частных производных:

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} + u \left[1 - f(c) - c \frac{df}{dc} \right] \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} = 0, \quad (3.39)$$

где $c(x, t)$ — общая концентрация олигомера во время t в точке x от начала колонки (предполагается, что x уже умножена на площадь поперечного сечения колонки), а u — скорость потока раствора через колонку ($u = dx/dt$). Если в качестве независимой переменной принять концентрацию свободного олигомера и учесть равенство $qc^b = f(c)\bar{c}$, то уравнение (3.39) превращается в

$$\frac{\partial \bar{c}}{\partial t} + \frac{u}{1 - \bar{f} + (\partial \bar{f} / \partial \ln c)} \frac{\partial \bar{c}}{\partial x} = 0. \quad (3.40)$$

Для начальных условий

$$\begin{aligned} t_0 &= 0, \\ x_0 &= \lambda, \\ c_0 &= \bar{h}(\lambda) \end{aligned} \quad (3.41)$$

уравнение (3.40) имеет решение:

$$\begin{aligned} \bar{c} &= \bar{h}(\lambda), \\ x &= \frac{ut}{1 - \bar{f}[\bar{h}(\lambda)] - (d\bar{f}/d \ln \bar{c})_{\bar{c}=\bar{h}(\lambda)}} + \lambda, \end{aligned} \quad (3.42)$$

где λ — параметр.

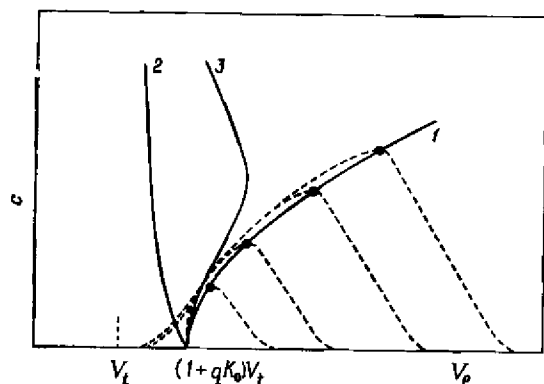


Рис. 3.11. Некоторые примеры траекторий пиков [11].

1 — изотерма кооперативного связывания без насыщения; 2 — изотерма некооперативного связывания с насыщением, т. е. изотерма типа Ленгмюра; 3 — изотерма кооперативного связывания с насыщением. Абсцисса — объем элюата; ордината — концентрация растворенного вещества; K_0 — независимый от концентрации член константы ассоциации. Пунктиром показаны исходные хроматограммы в случае кооперативного связывания, приведенные для вывода теоремы траектории пиков.

Если $\bar{h}(\lambda) = c_0 e^{-\lambda^2/\Delta}$, кривая элюирования дается уравнением в неявной форме:

$$\bar{c} = \bar{c}_0 \exp \left\{ -\frac{1}{\Delta} \left[V_t - \frac{V_e}{1 + \bar{f}(\bar{c}) + \bar{c}(d\bar{f}/d\bar{c})} \right]^2 \right\}, \quad (3.43)$$

где V_t — объем колонки, V_e — объем элюата ($V_c = ut$). Уравнение пика на кривой элюирования имеет вид

$$V_e^{\max} = \left[1 + \bar{f}(c^{\max}) + (d\bar{f}/d \ln \bar{c})_{\bar{c}=\bar{c}^{\max}} \right] V_t. \quad (3.44)$$

Это уравнение дает «траекторию пика», т. е. зависимость $V_e^{\max}$ от $\bar{c}^{\max}$. На рис. 3.11 показаны некоторые траектории пиков элюиро-

вания для а) изотермы кооперативного связывания без насыщения участков связывания, б) изотермы некооперативного связывания с насыщением (изотерма типа Ленгмюра), в) изотермы кооперативного связывания с насыщением.

Отрезок $V_e(0)$ траектории пиков на оси V_e дает константу ассоциации при бесконечном разбавлении, а тангенс угла наклона касательной к кривой в точке $V'_e(0)$ дает первый нелинейный член j . Термодинамические параметры для системы олигоадениловая кислота — полиуридиловая кислота, определяемые этим способом, таковы:

$$\chi S^2 = \frac{1}{4} \cdot \frac{V'_e(0)}{V_e(0) - V_t} + \frac{5}{2} \cdot \frac{V_e(0) - V_t}{qc_u V_t} \quad (\text{л} \cdot \text{моль}), \quad (3.45)$$

$$\sigma = \frac{4 [V_e(0) - V_t]^2}{qc_u V_t V'_e(0) + 10 [V_e(0) - V_t]^2}. \quad (3.46)$$

В качестве вывода из своих рассуждений Окада и сотр. [11] опубликовали *теорему траекторий пиков*: любая кривая элюирования пересекает траекторию пиков (или ее касается) только в одной точке (т. е. в пике). Теорема легко выводится из леммы о кривой элюирования: кривые элюирования для различных концентраций вводимого вещества не пересекаются друг с другом. Простое доказательство леммы исходит из условия, что начальная кривая $\bar{h}(\lambda)$ линейно зависит от концентрации вводимого вещества. Из теоремы можно получить схематическую диаграмму для класса кривых элюирования, как показано пунктирными кривыми на рис. 3.11 для начальной формы. Практическое совпадение начальных участков кривых элюирования хорошо объяснимо из этой теоремы.

Список используемых обозначений

- N — степень полимеризации олигоадениловой кислоты
- $c_u, \bar{c}_u$ — концентрация всех или соответственно свободных участков связывания на цепи полиуридиловой кислоты
- $c, \bar{c}$ — концентрация всей или соответственно свободной олигоадениловой кислоты
- $\theta_u = (c_u - \bar{c}_u)/c_u$ — содержание спиральной формы в полиуридиловой кислоте
- $f'(c) = (c - \bar{c})/c$ — коэффициент сорбции олигомера на полимере как функция общей концентрации олигомера
- s — функция разделения нуклеотидной пары в связанном состоянии, если функция разделения в

свободном состоянии принимается равной единице

s_1 — функция разделения связанного олигомера, имеющего рядом связанный олигомер и комплементарный ему участок

$\chi - s_1(s^N \bar{c})$ — фактор коррекции для концевых эффектов олигомера

σ — параметр межоллигомерной кооперации (равный отношению функции разделения изолированного связанного олигомера и комплементарного ему участка к s_1).

3.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Приложение статистической теории хроматографии, развитой Гиддингсом и Эйрингом (теория тарелок), к аффинной хроматографии осуществлено Денизо и Делаажем [2]. С помощью удобных выражений установлены моменты приближения к распределению Лапласа — Гаусса. Гауссовский характер не сохраняется, если принимать во внимание другие причины дисперсии, но выражение в общем виде может быть получено. Эти авторы также нашли простой способ выражения фундаментальных констант для модели, основанной только на экспериментальных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Damle V. N., *Biopolymers*, **9**, 353—372 (1970).
2. Denizot F. C., De Laage M. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **72**, 4840—4843 (1975).
3. Graves D. J., Wu Y. T., *Methods Enzymol.*, **34**, 140—163 (1974).
4. Harvey M. J., Lowe C. R., Craven D. B., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **41**, 335—340 (1974).
5. Hierowski M., Brodersen R., *Biochim. Biophys. Acta*, **354**, 121—129 (1974).
6. Kasche V., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **38**, 875—881 (1970).
7. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **41**, 341—345 (1974).
8. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **42**, 1—6 (1974).
9. Magee Jr. W. S., Gibbs J. H., Zimm B. H., *Biopolymers*, **1**, 133—143 (1963).
10. Nishikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H., *Advan. Exp. Med. Biol.*, **42**, 33—42 (1974).
11. Okada S., Husimi Y., Tanabe S., Wada A., *Biopolymers*, **14**, 33—49 (1975).
12. Porath J., *Methods Enzymol.*, **34**, 13—30 (1974).
13. Porath J., Kristiansen T., in: *The Proteins*, H. Neurath, R. L. Hill (Eds.), Academic Press, New York, 3rd ed., 1975, pp. 95—178.
14. Reiner R. H., Walch A., *Chromatographia*, **4**, 578—587 (1971).
15. Steers E., Cuatrecasas P., Pollard H. B., *J. Biol. Chem.*, **246**, 196—200 (1971).
16. Turková J., Bláha K., Valentová O., Čoupek J., Seifertová A., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 586—593 (1976).

Применение аффинной хроматографии для количественной оценки специфического комплексообразования

Процессы ассоциации без сомнения играют одну из наиболее важных ролей в биохимии. Начальная степень связывания субстрата оказывает значительное влияние на каталитические свойства фермента. Контролируемые процессы в биологии зависят от ассоциации репрессора с опероном, гормонов со специфическими рецепторами и т. п. Важную роль играют специфические комплексы цепей нуклеиновых кислот или антител с антигенами. Методы прямого определения взаимодействий лиганд — белок, такие, как равновесный диализ, ультрафильтрация, гель-фильтрация, спектроскопические методы и анализ стационарной кинетики, в настоящее время дополнились определением констант диссоциации, основанным на аффинной хроматографии [1—3, 6—8, 10—12].

Применение аффинной хроматографии для изучения взаимодействий в биологических комплексах кажется весьма обещающим. Однако в настоящее время из немногих работ, количественно описывающих взаимодействия по результатам аффинной хроматографии, нельзя сделать никаких обобщающих выводов. В данной главе детально описывается определение констант диссоциации комплексов нуклеазы с ее ингибиторами по данным элюирования, а также использование этих же данных для определения констант диссоциации комплексов химотрипсина с синтетическими низкомолекулярными и с природными высокомолекулярными ингибиторами (разд. 4.1). Далее рассматривается определение констант диссоциации комплексов трипсина с низкомолекулярными ингибиторами по данным фронтального анализа (разд. 4.2). В разд. 4.3 обсуждается кооперативное элюирование олигоадениловой кислоты при ее хроматографии на иммобилизованной полиуридилловой кислоте. В заключение главы описывается прямое титрование белка S-рибонуклеазы S-пептидом, определение силы связывания дегидрогеназ и нуклеотидов, основанное на данных о концентрации хлорида калия, необходимой для элюирования, и взаимодействия связанных нуклеотидов и пептидов по отношению объемов элюирования последних.

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ ПО ДАННЫМ ЭЛЮИРОВАНИЯ

Наиболее часто используемый метод количественной аффинной хроматографии основан на элюировании биологических макромолекул с аффинной матрицы растворами аффинантов в различных концентрациях [7].

Объем элюирования макромолекулярного вещества прямо пропорционален концентрации аффинного лиганда, связанного с нерастворимым носителем, если концентрация растворимого аффинного лиганда постоянна. Кроме того, он обратно пропорционален концентрации растворимого аффинанта, если концентрация иммобилизованного аффинанта постоянна. Эти зависимости выражаются уравнением

$$V = V_0 + \frac{(V_0 - V_m) \frac{[L]}{K_L}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}, \quad (4.1)$$

где V — объем элюирования; V_0 — объем элюирования макромолекулярного соединения при отсутствии взаимодействий с иммобилизованным лигандом (например, с ферментом в присутствии сильного ингибитора); V_m — свободный объем, определяемый, например, при элюировании голубого декстрана; $[L]$ — концентрация иммобилизованного лиганда, определяемая на основании операционной емкости сорбента; K_L — константа диссоциации комплекса макромолекулярного соединения с иммобилизованным лигандом; $[I]$ — концентрация растворимого аффинного лиганда, K_I — константа диссоциации бинарного комплекса в растворе.

Справедливость этого уравнения проверена Данном и Чейке-ном [7] при исследовании хроматографического поведения стафилококковой нуклеазы на тимидин-3'-(n -сефароза-аминофенилфосфат)-5'-фосфате (pdTrAP-сефарозе) от концентрации как иммобилизованного нуклеотида, так и растворимого нуклеотида, использованных для элюирования нуклеазы.

На рис. 4.1 показано влияние разбавления аффинной матрицы незамещенной сефарозой. Во всех опытах, отличающихся только концентрацией иммобилизованного тимидин-3'-(n -аминофенилфосфат)-5'-фосфата (pdTrAP), раствором ингибитора тимидин-3',5'-бисфосфата (pdTp) из колонок pdTrAP-сефарозы элюируется одинаковое количество нуклеазы. Объем элюирования нуклеазы прямо пропорционален концентрации иммобилизованного нуклеотида (рис. 4.1, б). Приведенная зависимость согласуется с уравнением (4.1). Полученное при экстраполяции зависимости V от $[L]$ к $[L]=0$ значение V_0 очень хорошо согласуется с экспериментальным, которое найдено при элюировании фенолового крас-

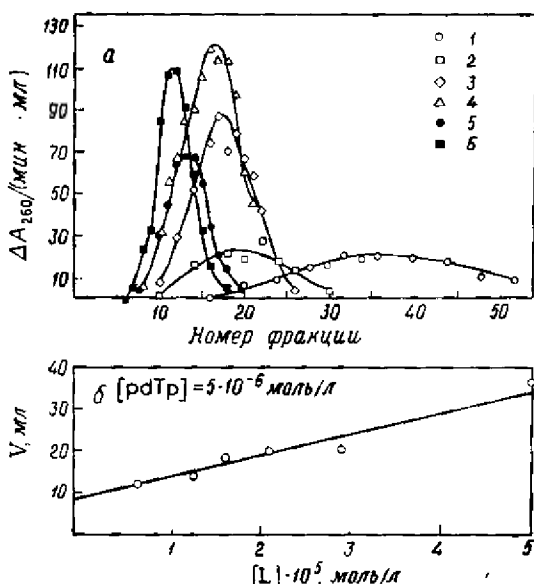


Рис. 4.1. Хроматография нуклеазы на тимидин-3'-(*p*-сефароза-аминофенилфосфат)-5'-фосфате (pdTrAP-сефарозе) [7].

a — зависимость от концентрации связанного лиганда $[L]$. Готовились смеси pdTrAP-сефарозы (аффинной матрицы) с немодифицированной сефарозой 4В (в мл/мл): 1 — 3,0:1; 2 — 2,5:2,5; 3 — 2:4; 4 — 1,5:4,5; 5 — 1:4; 6 — 0,5:4,5. Колонки (объемом 0,5 мл) наполнялись этими смесями и уравнивались $5 \cdot 10^{-6}$ М тимидин-3',5'-бисфосфатом (pdTr); на колонки носились образцы нуклеазы (по 200 мкг); для элюирования использовался 0,1 М NH_4 -ацетатный буферный раствор, содержащий $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л pdTr. $\Delta A_{260} \cdot \text{мкл}^{-1} \cdot \text{мл}$ — активность нуклеазы по гидролизу ДНК спермы лосося;

б — зависимость объема элюирования от концентрации иммобилизованного аффинного лиганда.

ного с той же колонки или при элюировании нуклеазы с колонки того же объема, заполненной немодифицированной сефарозой. На основании уравнения (4.1) тангенс угла наклона кривой на рис. 4.1, б дается соотношением

$$\text{Тангенс угла наклона} = \frac{(V_0 - V_m)/K_L}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}. \quad (4.2)$$

Следовательно, если известны одна из констант (K_L или K_I) и тангенс угла наклона, то может быть рассчитана и другая константа.

На рис. 4.2 показана зависимость объема элюирования нуклеазы от концентрации растворимого нуклеотида. Во всех опытах вводилось одинаковое количество нуклеазы в колонки pdTrAP-сефарозы, предварительно приведенные в равновесие с растворами pdTrAP в различных концентрациях: для элюирования использо-

вали растворы рdТрАР в адекватных концентрациях (рис. 4.2, б). При понижении концентрации ингибитора [I] пик белка становился шире и белок на колонке задерживался дольше.

Уравнение (4.1) можно преобразовать:

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{1}{(V_0 - V_m) \cdot \frac{[L]}{K_L}} + \frac{[I]}{K_I (V_0 - V_m) \cdot \frac{[L]}{K_L}}. \quad (4.3)$$

На рис. 4.2, б построена зависимость $\frac{1}{V - V_0}$ от [I] по данным, полученным на основании объемов элюирования (рис. 4.2, а):

$$\text{Тангенс угла наклона} = 1/K_I A, \quad (4.4)$$

$$\text{Отрезок, отсекаемый на оси ординат} = 1/A, \quad (4.5)$$

где $A = (V_0 - V_m) ([L]/K_L)$.

Из уравнений (4.4) и (4.5) следует, что частное от деления отрезка, отсекаемого на оси ординат, на тангенс угла наклона равно K_I . В выражение для отрезка, отсекаемого на оси ординат (рис. 4.2, б), входит K_L , и поэтому, если [L], V_0 и V_m известны, K_L можно рассчитать. В табл. 4.1 приведены значения K_I и K_L , определенные этим методом, они сопоставлены со значениями K_L , полученными из кинетических измерений или из данных равнове-

Таблица 4.1

Константа диссоциации комплекса аффинного лиганда со стафилококковой нуклеазой (рН 7,5, в присутствии 10 мМ CaCl_2)

Аффинный лиганд	K_I , моль/л		K_L^B , моль/л
	Хроматография ^а	Кинетика ^б	
Тимидин-3'-(<i>п</i> -аминофенилфосфат)-5'-монофосфат	$2,3 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$
Тимидин-3',5'-бисфосфат	$2,5 \cdot 10^{-6}^{\Gamma}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
Тимидин-5'-монофосфат	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \cdot 10^{-6}$
Тимидин-3'-фосфат-5'-(<i>п</i> -нитрофенилфосфат)	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-5}^{\Delta}$	$0,6 \cdot 10^{-6}$
Тимидин-3'-(<i>п</i> -нитрофенилфосфат)-5'-фосфат	$4,1 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$
Тимидин-3'-(<i>п</i> -нитрофенилфосфат)	$4,3 \cdot 10^{-6}$		$1,5 \cdot 10^{-6}$
Без лиганда			$1,2 \cdot 10^{-6}$

^а = 30%; по данным конкурентного элюирования.

^б = 30%; значения определены по графику Диксона [5].

^в = 50%; для связывания нуклеазы с тимидин-3'-(*п*-сефароза-аминофенилфосфат)-5'-фосфатом.

^г = 25%; по данным равновесного диализа.

^д K_m ; для ферментативного отщепления *п*-нитрофенилфосфата.

ного диализа. На основании соответствия между этими константами можно сделать вывод, что в этой системе связывание нуклеазы на аффинной матрице полностью обратимо и что иммобилизация лиганда не ограничивает комплексообразования.

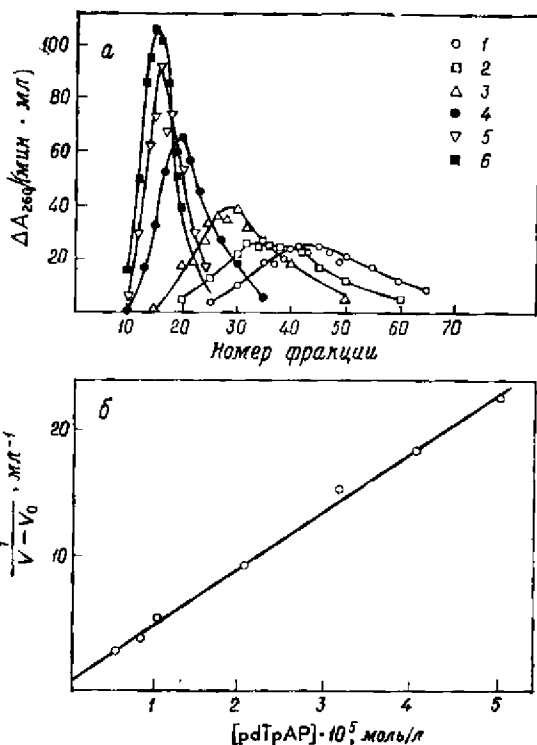


Рис. 4.2. Хроматография нуклеазы на тимидин-3'-(*p*-сефароза-аминофенилфосфат)-5'-фосфате (pdTrAP-сефарозе) [7].

a — зависимость от концентрации растворимого тимидин-3'-(*p*-аминофенилфосфат)-5'-фосфата (pdTrAP) в элюирующем буферном растворе. На колонки наносились образцы нуклеазы (по 200 мкг); колонки предварительно уравнивались 0,1 М ацетатом аммония, содержащим pdTrAP (моля/л): 1 — $0,5 \cdot 10^{-5}$; 2 — $0,75 \cdot 10^{-5}$; 3 — $1,0 \cdot 10^{-5}$; 4 — $2 \cdot 10^{-5}$; 5 — $3 \cdot 10^{-5}$; 6 — $4,0 \cdot 10^{-5}$; для элюирования использовались растворы соответствующего состава; *b* — зависимость $1/(V-V_0)$ от [pdTrAP] [уравнение (4.3)]; коэффициент корреляции $r=0,997$. Чтобы не загромождать рисунок, кривая элюирования для [pdTrAP] — $5 \cdot 10^{-4}$ моля/л не приведена на рис. 4.2, *a*, однако учитывалась при построении рис. 4.2, *b*.

По данным определения фосфата в кислотном гидролизате pdTrAP-сефарозы установлено, что концентрация pdTrAP в модифицированной сефарозе составляет $2,1 \cdot 10^{-4}$ моля/л. Однако из расчета констант диссоциации следовало, что концентрация pdTrAP, определенная из операционной емкости, соответствует $5 \cdot 10^{-5}$ моля/л. Из сравнения этих величин следует, что только

24% молекул нерастворимого лиганда способны связывать нуклеазу.

Константы K_L , полученные независимо при элюировании шестью различными аффинными лигандами, имели значения от $0,6 \cdot 10^{-6}$ до $2,6 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Отклонения K_L по-видимому, не зависят от природы заместителей, связанных с тимидином. Совпадение значений K_L (в пределах экспериментальной ошибки) показывает, что на взаимодействие между нуклеазой и аффинной матрицей не оказывает влияние присутствие другого лиганда. В отличие от K_L константа K_i сильно зависит от заместителей лиганда. Вероятно, идентичность значений K_i для рdTp и рdTpAP указывает на то, что аминокислотная группа пространственной «ножки» не влияет на взаимодействие нуклеазы с иммобилизованным нуклеотидом. Подобным образом из сопоставления K_i ($2,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и K_L ($1,1 \cdot 10^{-6}$ моль/л) для рdTpAP следует, что привязка нуклеотида к нерастворимому носителю не влияет на взаимодействие нуклеазы с рdTpAP, т. е. взаимодействие нуклеазы с лигандом в растворе и с иммобилизованным лигандом на нерастворимом носителе обусловлено одними и теми же силами. Следовательно, этот метод служит не только для определения констант диссоциации, но также и для оценки влияния иммобилизации на комплексообразование.

Против уравнений, выведенных Данном и Чейкеном [6], Николь и др. [12] высказали возражения. Данн и Чейкен [7] ограничились случаями, когда $[E]/K_L$ мало, т. е. используется очень низкая концентрация фермента. Другое ограничение касается взаимодействий со слишком низкими K_L . Например, если константа связывания равна 10^{-9} моль/л, то рассчитанная константа скорости диссоциации комплекса EL должна быть очень мала ($\sim 0,042 \text{ с}^{-1}$) [7]. Следовательно, элюирование белка должно зависеть от кинетических факторов и не может быть проведено за реальное время опыта. Добавление растворимого лиганда к раствору элюента не должно оказывать влияния на элюирование белка, поскольку диссоциация — мономолекулярный процесс. Такими кинетическими эффектами объясняются наблюдаемые иногда неудачи при элюировании некоторых ферментов с аффинных сорбентов буферными растворами, содержащими сильные ингибиторы. В некоторых случаях белковый пик настолько ушивается, что его нельзя обнаружить. Метод пригоден главным образом для случаев, когда доступны сорбенты, содержащие лиганды со средней силой связывания. В таких случаях система полностью обратима в пределах времени проведения хроматографического опыта.

Для более полного объяснения кривых элюирования ферментов растворами высокомолекулярных ингибиторов Туркова и др. [15] определили константы диссоциации комплекса химотрипсина с антилизинном по методу Данна и Чейкена [7]. Антилизин — поли-

валентный ингибитор протеаз, выделяемый из легких (фирма Lésiva, Прага, Чехословакия). По своим свойствам антилизин очень близок панкреатическому ингибитору трипсина. Сорбция химотрипсина на N-бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланин —

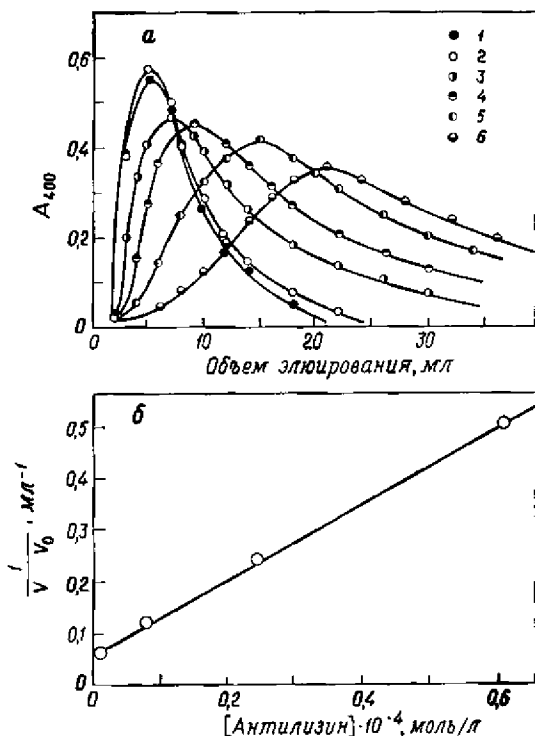


Рис. 4.3. Аффинная хроматография химотрипсина на N-бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланил-NH₂-сфере 300 (52×11 мм).

а — элюирование растворами с различными концентрациями (моль/л) антилизина в 0,05 М HCl-трис-буферном растворе (рН 8,0, 25 °С); 1 — $2,64 \cdot 10^{-4}$; 2 — $1,28 \cdot 10^{-4}$; 3 — $0,66 \cdot 10^{-4}$; 4 — $0,33 \cdot 10^{-4}$; 5 — $0,13 \cdot 10^{-4}$; 6 — $0,07 \cdot 10^{-4}$. На колонку, предварительно уравновешенную растворами с соответствующими концентрациями антилизина, наносилось 3,0 мг химотрипсина. Активность десорбируемого химотрипсина измерялась на регистрирующем спектрофотометре «Оптон» (Orpton); в качестве субстрата использовался L-нитрофениловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-тирозина (A_{400});

б — зависимость $1/(V - V_0)$ от молярной концентрации антилизина.

—NH₂-сфере проводилась в оптимальных условиях, взятых из данных, приведенных на рис. 3.1. Для элюирования использовались растворы антилизина в различных концентрациях. Концентрация иммобилизованного аффинного лиганда [L], определенная исходя из эффективной емкости колонки, составила $2,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Свободный объем V_m , найденный с помощью декстрана 2000, равен 2,1 мл. Константа диссоциации комплекса химотрипсина с

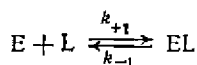
иммобилизованным ингибитором K_L равна $4,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, а константа диссоциации комплекса химотрипсина с антилизинном $K_I = 8,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л (рис. 4.3, а и б). Кроме того, проводилась аффинная хроматография химотрипсина на сфере со связанным антилизинном. После нахождения свободного объема ($V_m = 4,0$ мл) и концентрации иммобилизованного аффинанта ($[L] = 1,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л) рассчитывались константы диссоциации комплекса химотрипсина со связанным антилизинном $K_L = 9,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л и с растворимым антилизинном $K_I = 8,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Поскольку значения K_L и K_I очень близки, то можно сделать вывод, что на образование комплекса химотрипсина с антилизинном не оказывает влияния ковалентная привязка последнего к сфере. Константы диссоциации комплекса химотрипсина с антилизинном, как с растворимым, так и со связанным с матрицей, хорошо согласуются. Более того, они совпадают также с константой диссоциации комплекса антилизина с химотрипсином ($9,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л), найденной по кинетическим данным по Диксону [5]. Из тех же кинетических данных для субстрата *п*-нитрофенилового эфира *N*-бензилоксикарбонил-*л*-тирозина была определена константа Михаэлиса, значение которой $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л хорошо согласуется со значением $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, определенным другим методом [16].

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ДИССОЦИАЦИИ ПО ДАННЫМ ФРОНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА

Разновидность количественной аффинной хроматографии — фронтальный анализ [10]; он основан на понятии плотности L_0 аффинного лиганда на единицу длины колонки с агарозой. Если l — общая длина колонки с агарозой, а L_t — общее количество иммобилизованного лиганда в сорбенте, то $L_0 = L_t/l$. Если аффинный сорбент характеризуется слабым сродством, то раствор фермента в концентрации $[E_0]$ наносится на колонку непрерывно, а для элюирования фермента с колонки необходим объем V . Можно написать следующее уравнение:

$$(V - V_0)[E_0] = l[EL], \quad (4.6)$$

где V_0 — объем элюирования при отсутствии взаимодействия между активным центром фермента и иммобилизованным аффинным лигандом (например, в присутствии растворимого сильного конкурентного ингибитора), а $[EL]$ — плотность комплекса фермент—иммобилизованный лиганд на единицу длины колонки с агарозой. При комплексообразовании достигается равновесие



Если концентрация свободного фермента $[E] = [E_0]$, можно написать следующее уравнение:

$$K_L = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E][L]f_L}{[EL]f_{EL}} = \frac{[E_0]([L_0] - [EL])f_L}{[EL]f_{EL}} = \\ = \frac{1}{(V - V_0)f_{EL}} \cdot [L_0]f_L - [E_0] \cdot \frac{f_L}{f_{EL}} = \frac{L_0 f_L}{(V - V_0)f_{EL}} \cdot [E_0] \cdot \frac{f_L}{f_{EL}}, \quad (4.7)$$

где K_L — константа диссоциации комплекса фермент — иммобилизованный лиганд, $[L]$ — плотность незанятого лиганда на единицу длины и f — коэффициент активности реагента, подвижность которого ограничена. Если хроматография проводится в условиях, когда $[E_0] \ll K_L$, уравнение (4.7) можно переписать:

$$K_L = L_0 f_L / (V - V_0) f_{EL}. \quad (4.8)$$

Если фермент элюируется в различных условиях [(1) и (2)] объемами V_1 и V_2 , то

$$\frac{K_{L(1)}}{K_{L(2)}} = \frac{(V_2 - V_0)}{(V_1 - V_0)}, \quad (4.9)$$

где $K_{L(1)}$ и $K_{L(2)}$ — соответствующие константы диссоциации. Следовательно, уравнение (4.9) применимо также для сопоставления различных ферментов.

Если фермент элюируется объемом V_i в присутствии конкурентного ингибитора в концентрации $[I_0]$ (когда $[I_0] \gg [E_0]$), то можно вывести следующее уравнение:

$$K_{L(1)} / K_L = 1 + [I_0] / K_I = (V - V_0) / (V_i - V_0), \quad (4.10)$$

где K_I — константа диссоциации комплекса фермент — растворимый ингибитор, определяемая соотношением

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}. \quad (4.11)$$

Согласно определению, $K_{L(1)}$ является наблюдаемой константой диссоциации комплекса фермент — иммобилизованный лиганд в присутствии растворимого ингибитора:

$$K_{L(1)} = ([E] + [EI])[L]f_L / [EL]f_{EL}. \quad (4.12)$$

Уравнение (4.10) можно переписать:

$$(V - V_i) / (V - V_0) = 1 / (1 + K_I / [I_0]). \quad (4.13)$$

Откуда следует, что $(V - V_i) / (V - V_0)$ равно отношению концентрации комплекса фермент — растворимый ингибитор к общей концентрации фермента. Концентрация ингибитора, при которой $(V - V_i) / (V - V_0) = 0,5$, равна K_I . Уравнение (4.13) можно записать в другой форме:

$$V_i = V_0 + K_I (V - V_i) / [I_0]. \quad (4.14)$$

Если построить график зависимости V_i от $(V-V_i)/[I_0]$, то K_1 и V_0 можно рассчитать исходя из тангенса угла наклона и отрезка, отсекаемого на оси ординат. Если V_0 и V известны, то K_1 для любого конкурентного ингибитора можно получить из одного хроматографического опыта в присутствии соответствующего ингибитора.

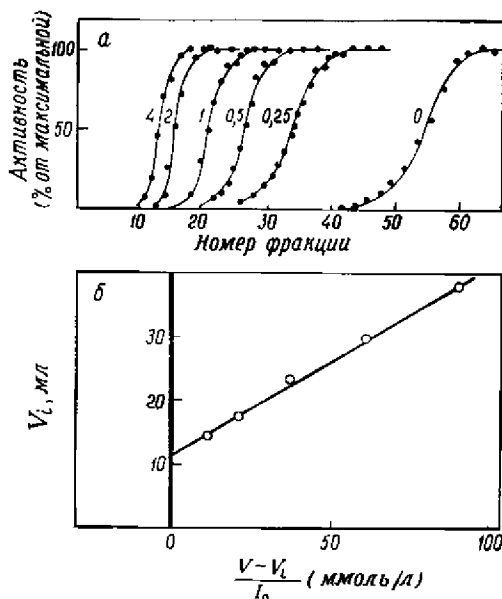


Рис. 4.4. Хроматография бычьего трипсина на глицилглицил-L-аргинин-сефарозе (180×6 мм, 5,1 мл) [10].

а — зависимость от концентрации (ммоль/л) бензилоксикарбониларгинина в 0,1 трис-малеатном буферном растворе (рН 6,2). Бычий β -трипсин наносился в колонку в виде соответствующих растворов в том же буфере (~ 10 мкг/мл, т. е. $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) непрерывно. Скорость потока 3 мл/ч, объем фракций 1,1 мл. Хроматография проводилась в холодной комнате (4°C). Элюирование фермента определялось по ферментативной активности с п-нитроанилидом бензоил-D,L-аргинина в качестве субстрата. За объем элюирования принимался объем, в котором концентрация выходящего фермента достигала половины высоты плато;
б — зависимость V_i от $(V-V_i)/I_0$.

На рис. 4.4,а приведены данные по хроматографическому поведению бычьего трипсина на сефарозе с ковалентно связанным глицилглицил-L-аргинином (2,2 мкмоль пептида на 1 мл сефарозы). На аффинный сорбент, уравновешенный данными концентрациями ингибитора (бензилоксикарбониларгинина) всегда наносился раствор трипсина, содержащий ингибитор в соответствующей концентрации. График зависимости V_i от $(V-V_i)/[I_0]$ (рис. 4.4,б) представляет собой прямую, что подтверждает справедливость выведенного уравнения. Из тангенса угла наклона и отрезка, отсекаемого на оси ординат, получены $K_1 = 0,29$ ммоль/л и $V_0 = 11,6$ мл. Для бензилоксикарбониларгинина K_1 , определенная

в растворе в тех же условиях по ингибированию ферментативного гидролиза *n*-нитроанилида бензоил-*L*-аргинина по Диксону [5], равна $0,17$ ммоль/л. Небольшие различия могли возникнуть в результате использования условий, оптимальных для сорбции, но менее подходящих для кинетического анализа.

Используя описанный метод, Касаи и Ишии [10] определили K_i для различных ингибиторов. Для α - и β -трипсинов и трипсина из *Stseptomycetes griseus* определены K_i на сефарозе со связанным глицилглицил-*L*-аргинином; для β -трипсина изучено также влияние на K_i различных концентраций солей. Поскольку нет никаких данных о коэффициентах активности f , их значения были приняты равными единице.

Преимуществами метода Касаи и Ишии [10] являются его чувствительность и простота: для исследования необходимо лишь небольшое количество белка; по сравнению с методом Данна и Чейкена [7] в этом методе концентрация фермента очень мала относительно K_L ; использование фронтального анализа упрощает выведенные уравнения; объемы элюирования можно определить более точно, поскольку они практически не зависят от концентрации. При использовании этого метода для определения констант диссоциации химотрипсина на сфероне, к которому был привязан с помощью гидрофобного гексаметилендиамина *N*-бензилоксикарбонилглицил-*D*-фенилаланин, Туркова и др. [15] встретились с трудностями, обусловленными, очевидно, неспецифической сорбцией.

Для трипсина описанным методом на колонке со сфероном, к которому присоединен через гексаметилендиамин *n*-аминобензамидин, определены K_i , которые оказались равными: для бензоил-*L*-аргинина $5,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, *n*-бутиламина $3,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л, бензиламина $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, бензамидина $5,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л и *n*-аминобензамидина $1,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Найденные по методу Данна и Чейкена [7] значения K_i для трипсина на такой же колонке равны: для бензоил-*L*-аргинина $5,3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, *n*-бутиламина $1,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л, бензиламина $3,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, бензамидина $6,7 \cdot 10^{-5}$ моль/л и *n*-аминобензамидина $1,9 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Эти величины хорошо согласуются с вычисленными из кинетических данных. Для иммобилизованного *n*-аминобензамидина K_L равна $3,7 \cdot 10^{-6}$ моль/л по методу Касаи и Ишии [10] и $1,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л по методу Данна и Чейкена [7]. Зависимости $1/(V_i - V_0)$ от $1/K_i$ (метод Данна и Чейкена [7]) и V_i от $K_i(V - V_i)$ (метод Касаи и Ишии [10]) для различных ингибиторов в идентичных концентрациях линейны. Следовательно, если имеется колонка с иммобилизованным ингибитором и по значениям K_i известных ингибиторов определен тангенс угла наклона кривой, то для неизвестных ингибиторов K_i можно найти после измерения соответствующих объемов элюирования [15].

4.3. КООПЕРАТИВНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ ОЛИГОАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В ХРОМАТОГРАФИИ НА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПОЛИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЕ [13]*

Анализ кривых элюирования макромолекул, специфически сорбируемых на аффинном сорбенте, является потенциальным аналитическим методом для изучения специфических взаимодействий биополимеров. Кривые элюирования очень близки к изотермам связывания элюируемого вещества с иммобилизованным аффинантом, и, следовательно, из хроматограммы можно получить термодинамические параметры молекулярных взаимодействий. Метод эквивалентен повторяющемуся диализу и имеет много преимуществ по сравнению с обычным равновесным диализом. Например, он требует намного более низких концентраций и небольших количеств образца, несколько образцов разных молекул можно наносить одновременно и обнаруживать небольшие различия в связывающих способностях при хорошем разделении.

Метод анализа кривых элюирования применен в колоночной хроматографии олигоадениловой кислоты на агарозе со связанной полиуридилловой кислотой при нескольких температурах и концентрациях олигоадениловой кислоты. Теория кооперативного связывания олигонуклеотидов с полинуклеотидом была расширена таким образом, что эта хроматографическая система может быть описана теорией теоретических тарелок, как упоминалось в разд. 3.2.

Связывание олигоадениловой кислоты с полиуридилловой кислотой носит кооперативный характер, и стабильность комплекса зависит от температуры и концентрации олигоадениловой кислоты. Следовательно, характер кривых элюирования олигоадениловой кислоты, хроматографируемой на агарозе с иммобилизованной полиуридилловой кислотой, зависит от концентрации олигоадениловой кислоты и температуры, как это следует из рис. 3.9 и 3.10.

Ряд термодинамических параметров был получен из экспериментальных изотерм связывания. Член $(\chi s^2)^{-1}$ был определен исходя из концентрации свободного олигомера в точке перегиба изотермы связывания, а член $(4\sqrt{2}/\sigma)^{-1}$ — исходя из тангенса угла наклона изотермы связывания в этой точке. Такие приемы оправданы, если $\sigma \ll 1$. Для σ было найдено значение 0,017.

В данных экспериментальных условиях комплекс полиуридилловой кислоты с олигоадениловой кислотой в растворе находится в виде свитой тройной спирали. Следовательно, чтобы рассчитать

* Список обозначений см. на стр. 57.

изотерму связывания, следует принять во внимание энтропию образования петли свитой вдвое полиуридиловой кислоты. Используя полилогарифмическую функцию $Li_2(x)$ из

$$\bar{c} = [\gamma s^N \rho^{N-1} (\rho - bA)]^{-1}, \quad (4.15)$$

получаем

$$c = \bar{c} + c_u \cdot \frac{\rho - bA}{\rho + b[2\sqrt{\rho}/(1 - \sqrt{\rho}) + 2\lg(1 - \sqrt{\rho}) - \rho] + (N-1)(\rho - bA)}, \quad (4.16)$$

где

$$A = 4 \lg(1 - \sqrt{\rho}) + 4Li_2(\sqrt{\rho}) + \rho.$$

Когда ρ — параметр, можно получить изотерму связывания. Если принять во внимание влияние исключаящего объема, то параметр a можно принять равным 2. Он входит во множитель функции разделения, возникающий благодаря образованию петель спирали:

$$2^a \cdot b(j+1)/(j+2)^a.$$

Полагая известным кооперативный параметр b (0,1—0,001), можно смоделировать изотерму связывания и кривые элюирования; при этом полученные кривые элюирования будут иметь прямоугольный вид, поскольку при некоторой концентрации олигомера изотерма связывания резко стремится к нулю, что отражает влияние энтропии образования петли из двух цепей полимера. Однако экспериментальные кривые элюирования не являются прямоугольными (рис. 3.10) и экспериментальная изотерма связывания не стремится резко к нулю (рис. 3.8).

Расхождение теоретической модели и экспериментальных данных можно объяснить следующим образом. Поскольку отношение c_u/c равно 10^2 — 10^3 и число дифосфатных групп в полиуридиловой кислоте составляет 10^2 — 10^3 на макромолекулу, образованием петли полиуридиловой кислоты с олигодениловой кислотой при их свивании можно пренебречь (для бесконечно длинных полимеров такое приближение неправильно). Следовательно, в двойной или тройной спиралях можно не принимать во внимание петли. В данных экспериментальных условиях полиуридиловая кислота, по крайней мере частично, образует двойную спираль. Следовательно, предложенное выше решение, подтвержденное в случае образования двойной спирали, верно также и в случае образования тройной спирали при кооперативной адсорбции на линейной цепи.

Химическое освобождение связанного олигомера протекает за ~ 10 мс, это достаточно быстро по сравнению с временем диффузии внутрь геля при скорости потока 5—40 мл/ч. Поэтому предположение, что устанавливается химическое равновесие, справедливо. Хотя нельзя считать, что при элюировании скорость потока

(20 мл/ч) достаточно мала по сравнению со скоростью диффузии. кривые элюирования сохраняют свой вид даже при восьмикратном изменении скорости потока. Следовательно, число тарелок, по-видимому, достаточно велико и данное аналитическое решение верно.

Используя уравнение (3.46) (разд. 3.2), можно определить термодинамические параметры, исходя из траектории экспериментального пика. Пересечение траектории с осью V_e дает функцию разделения для изолируемого связанного олигомера:

$$\frac{V_e(0) - V_t}{V_t} = \sigma \chi s^2 q c_u \quad (4.17)$$

а наклон в этой точке дает функцию разделения:

$$\frac{1}{V_t} \left(\frac{dV_e}{dc} \right)_{\bar{c}=0} = 2(2 - 5\sigma) \sigma (\chi s^2)^2 q c_u. \quad (4.18)$$

По этому методу при $q = 0,55$ и $c_u = 0,98 \cdot 10^{-3}$ моль/л для 1 М раствора хлорида натрия при 10°C найдено $\chi s^2 = 3,4 \cdot 10^4$ л/моль ($\pm 50\%$), а при 5°C $\chi s^2 = 8 \cdot 10^4$ л/моль ($\pm 50\%$). К сожалению, $\bar{c}$, от которой зависит удовлетворительное соотношение сигнал — шум для кривой элюирования, недостаточно мала, чтобы можно было ограничиться двухчленным приближением. В результате траектория пика — вогнутая и оба значения нельзя определить с достаточной точностью, однако они очень приближенно соответствуют величинам, получаемым из изотермы связывания.

Список используемых обозначений

- N — степень полимеризации олигодениловой кислоты
- $c_u, \bar{c}_u$ — концентрация всех и свободных участков связывания в цепи полиуридилловой кислоты соответственно
- $c, \bar{c}$ — концентрация всей и свободной олигодениловой кислоты соответственно
- $\theta_u = (c_u - \bar{c}_u)/c_u$ — содержание спиральной формы в полиуридилловой кислоте
- $f(c) = (c_u - \bar{c}_u)/c_u$ — коэффициент адсорбции олигомера на полимере как функция общей концентрации олигомера
- s — функция разделения нуклеотидной пары в связанном состоянии, если функция разделения в свободном состоянии принимается равной единице
- s_1 — функция разделения связанного олигомера, имеющего соседний связанный олигомер и элементарный ему участок

- $\chi = s_1(s^N \bar{c})$ — поправочный коэффициент для концевых эффектов олигомера
 σ — параметр межполимерной кооперативности (равный отношению функции разделения изолируемого связанного олигомера и его комплекта к s_1)

4.4. ДРУГИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ АФФИННЫМИ ЛИГАНДАМИ

Возможность получения количественных данных по отношению для взаимодействия белков с иммобилизованным лигандом впервые исследована Гавронским и Уолдом [8]. Определена константа диссоциации, равная $(2,5 \pm 1,0) \cdot 10^{-6}$ моль/л, путем титрования S-белка рибонуклеазы, связанного с S-пептидом, иммобилизованным на агарозе. Хорошие кривые титрования получены при концентрации S-белка 10^{-7} — 10^{-5} моль/л. Когда концентрация связанного белка равна концентрации белок-пептидного комплекса, взаимодействие может быть описано соотношением

$$\frac{1}{[\text{Связанный S-белок}]} = \frac{1}{[\text{Свободный S-белок}]} \times \\ \times \frac{K_d}{[\text{Весь S-пептид}]} + \frac{1}{[\text{Весь S-пептид}]}.$$

Концентрационная зависимость $[\text{Связанный S-белок}]^{-1}$ от $[\text{Свободный S-белок}]^{-1}$ (рис. 4.5) линейна. Отрезки, отсекаемые на абсциссе и ординате, дают соответственно K_d^{-1} и $[\text{Весь S-пептид}]^{-1}$. Конечно, это соотношение справедливо только для систем, для которых имеется уверенность, что нет никакой неспецифической сорбции исследуемого белка.

Сравнивая связывание различных дегидрогеназ и киназ на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозе и P^{1-} -(6-аминогексил)- P^{2-} -(5'-аденозин)пирофосфат—сефарозе, Харвей и др. [9] выразили силу взаимодействия между ферментом и иммобилизованным нуклеотидом с помощью так называемой «связываемости» β . Этот параметр представляет собой концентрацию хлорида калия (мМоль/л) в центре пика фермента при элюировании фермента линейным градиентом концентрации KCl (рис. 4.6 и табл. 4.2). Для определения константы диссоциации комплекса лактатдегидрогеназы с N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP, связанным с сефарозой, Лоу и др. [11] использовали линейную зависимость между количеством связанного фермента и концентрацией иммобилизованного нуклеотида.

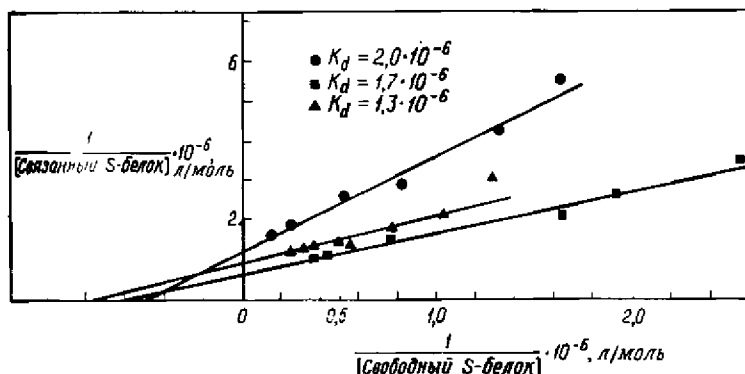


Рис. 4.5. Типичные графики, получаемые при изучении связывания прямым титрованием S-пептид—агарозы S-белком при pH 7,5 [8].

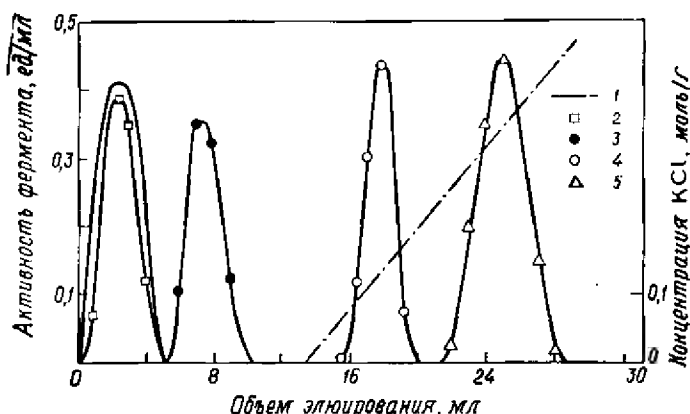


Рис. 4.6. Хроматография сырого экстракта дрожжей на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозе [4].

Образец (100 мкл) сырого экстракта дрожжей наносился на колонку (50×5 мм), содержащую 0,5 г N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозу, предварительно уравновешенную 10 мМ (KH₂PO₄+KOH); pH 7,5. После отмывки неадсорбированных белков ферменты элюировались в линейном градиенте концентрации (0–1 моль/л) KCl (общий объем элюата 20 мл); скорость потока 8 мл/ч. В элюате обнаружены: 1 — инертный белок; 2 — глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа; 3 — глутатионредуктаза; 4 — малатдегидрогеназа и 5 — дрожжевая алкогольдегидрогеназа.

Для изучения взаимодействий пептидов с нуклеотидами была использована хроматография пептидов на поливиниловом спирте, замещенном олигодезокситимидиловой кислотой и необратимо связанном с ДЭАЭ-целлюлозой ионными связями [14]. Для этого типа хроматографии был введен термин «матричная хроматография». Количественная мера пептид-нуклеотидного взаимодействия возрастает с задержкой пептида на олигонуклеотид — ДЭАЭ-цел-

Таблица 4.2

Сравнение связывающей способности различных ферментов
 N^6 -(5-аминогексил)-5'-AMP—сефарозой (I) и P^{12} -(6-аминогексил)-
 P^{12} -(5'-аденозин)пирофосфат—сефарозой (II)

Фермент		Источник	Связываемость β	
кодový номер	название		I	II
КФ 1.1.1.27	Лактатдегидрогеназа	Сердце свиньи	$\geq 1000^6$	$\geq 1000^6$
КФ 1.1.1.49	Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	Мышца кролика	$\geq 1000^6$	$\geq 1000^6$
КФ 1.1.1.37	Малатдегидрогеназа	Дрожжи	0	170
КФ 1.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа	Сердце свиньи	65	490
КФ 1.1.1.1	Алкогольдегидрогеназа	Дрожжи	400	0
КФ 1.2.1.12	<i>n</i> -Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Мышца кролика	0	$> 1000^6$
КФ 2.7.2.3	3-Фосфоглицераткиназа	Дрожжи	70	260
КФ 2.7.1.40	Пируваткиназа	Мышца кролика	100	110
КФ 2.7.1.1	Гексокиназа	Дрожжи	0	0
КФ 2.7.3.2	Креатинкиназа	Мышца кролика	0	0
КФ 2.7.4.3	Миокиназа	То же	0	380
КФ 2.7.1.30	Глинерокиназа	<i>Candida mycoderma</i>	122	0

¹ Связываемость β отражает меру силы взаимодействия фермента с иммобилизованным нуклеотидом и соответствует концентрации (мкмоль/л) KCl в центре пика фермента при элюировании фермента линейным градиентом концентрации KCl. На колонку (30x5 мм), содержащую 1 г аффинного сорбента, наносили 5 Е фермента. I — 1,5 мкмоль·мл AMP, II — 6,0 мкмоль·мл AMP.

⁶ Для элюирования вводили 200 мкл 5 мМ NADH.

люлозе по сравнению с движением пептида при хроматографии на немодифицированной ДЭАЭ-целлюлозе. Для того чтобы исключить возможное влияние параметров различных колонок, Шот и др. [14] выразили все объемы элюирования относительно объема элюирования аланина, для которого не обнаружено заметно задержки на этих колонках. Отношение относительных объемов элюирования (V_r), таким образом, равно отношению объемов элюирования исследуемого пептида $V_{набл}$ и аланина V_{Ala} ($V_r = V_{набл}/V_{Ala}$). Следовательно, взаимодействие пептид — олигонуклеотид оценивается по разности относительных объемов элюирования (ΔV_r) при хроматографии на двух колонках.

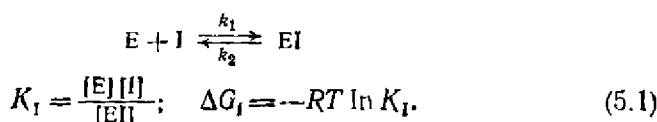
Определение констант диссоциации бинарных комплексов дегидрогеназ с NADH по концентрациям NADH, необходимых для элюирования, уже рассматривалось в гл. 2 (рис. 2.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

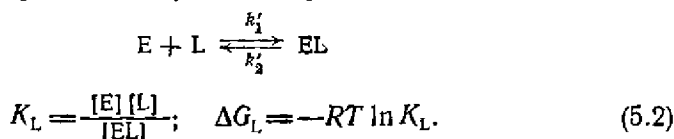
1. Andrews P., Kitchen B. J., Winzor D. J., *Biochem. J.*, **135**, 897—900 (1973).
2. Brinkworth R. I., Masters C. J., Winzor D. J., *Biochem. J.*, **151**, 631—636 (1975).
3. Chaiken I. M., Taylor H. C., *J. Biol. Chem.*, **251**, 2044—2048 (1976).
4. Craven D. B., Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **41**, 329—333 (1974).
5. Dixon M., *Biochem. J.*, **55**, 170—171 (1953).
6. Dunn B. M., Chaiken I. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 2382—2385 (1974).
7. Dunn B. M., Chaiken I. M., *Biochemistry*, **14**, 2343—2349 (1975).
8. Gawronski T. H., Wold F., *Biochemistry*, **11**, 442—448 (1972).
9. Harvey M. J., Lowe C. R., Craven D. B., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **41**, 335—340 (1974).
10. Kasai K., Ishii S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**, 261—264 (1975).
11. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., *Eur. J. Biochem.*, **42**, 1—6 (1974).
12. Nichol L. W., Ogston A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H., *Biochem. J.*, **143**, 435—443 (1974).
13. Okada S., Husimi Y., Tanabe S., Wada A., *Biopolymers*, **14**, 33—49 (1975).
14. Schott H., Eckstein H., Gutfeld I., Bayer E., *Biochemistry*, **14**, 5541—5548 (1975).
15. Turková J., Stránská M., Bláha K., Coupek J., unpublished work.
16. Walsh K. A., Wilcox P. E., *Methods Enzymol.*, **19**, 31—41 (1970).

Общие вопросы связывания на аффинном сорбенте

Связывание мономерного аффинанта, например ингибитора I с ферментом E, характеризуется константой равновесия K_I в предположении, что фермент существует в единственной третичной конформации:



Привязка аффинанта к нерастворимому носителю в определенной мере сказывается на константе равновесия K_I . Увеличение K_I обусловлено модификацией аффинанта связыванием с матрицей, следствием чего является ограничение стерической доступности аффинанта. Напротив, уменьшение K_I вызывается неспецифической сорбцией фермента на нерастворимом носителе и на уже сорбированном ферменте. Если предположить, что в неочищенном препарате белка только один фермент имеет сродство к матрице, равновесие между привязанным аффинантом и выделяемым ферментом можно выразить следующим образом:



Для успешного выделения фермента с помощью аффинной хроматографии необходимы очень низкие значения K_I или K_L . Обе константы должны быть много меньше, чем любая константа диссоциации для неспецифической сорбции белка на поверхности матрицы. Максимум для K_L может быть оценен следующим образом. Исходя из концентрации ингибитора в нерастворимом аффинанте, равной 10^{-3} моль/л, и требования 99%-ного связывания фермента при хроматографии неочищенного материала, содержащего 10^{-5} моль/л фермента в объеме, равном тройному объему нерастворимого аффинанта, в качестве верхнего предела для K_I получают значение 10^{-4} моль/л. В 3%-ном растворе белка, содержащем активный фермент с молекулярной массой 10^5 в количестве

10% от всего белка, в указанных выше условиях используется ~10% емкости матрицы.

Отсюда следует, что, поскольку между ингибитором и ферментом образуется связь, в целом процесс очистки следует рассматривать скорее как осаждение, а не как хроматографию. Это может быть продемонстрировано изотермой адсорбции для аффинной хроматографии, приведенной на рис. 5.1: суммарная изотерма адсорбции (3) может быть определена как сумма изотерм специфической (1) и неспецифической (2) адсорбции. Специфическая изотерма адсорбции характеризует идеальную специфическую сорбцию с постоянной и относительно высокой адсорбционной энергией ΔG для всех адсорбируемых частиц. Сорбция прекращается, когда все доступные «аффинантные» центры заняты. Изотерма неспецифической адсорбции характеризует сорбцию белков на неспецифических участках матрицы и на молекулах уже сорбированного белка.

Величина ΔG_L складывается из ΔG_1 и $\Delta G_{\text{неспец}}$, где $\Delta G_{\text{неспец}}$ — энергия реакции неспецифического комплексообразования и вклад пространственных ограничений. Если для K_1 принять среднее значение 10^{-5} моль/л, то $\Delta G_1 \approx 7$ ккал/моль.

Адсорбционная энергия для неспецифической сорбции $\Delta G_{\text{неспец}}$ складывается из энергии гидрофобных, гидрофильных или даже ионных взаимодействий и сопоставима с адсорбционной энергией в обычной хроматографии. Она очень сильно зависит от природы нерастворимого носителя и белка. $\Delta G_{\text{неспец}}$ должна быть по возможности низкой, потому что она включает также сорбцию молекул, которые образуют неспецифические комплексы с аффинантом.

Однако иногда в неочищенном белке содержатся два или более фермента, обнаруживающих сродство к связанному аффинанту. Если константа равновесия реакции для второго фермента $K_1(\text{II}) > 10^{-3}$ моль/л, то только незначительные количества второго фермента будут задерживаться на носителе вместе с выделяемым ферментом. Если $K_1(\text{II}) \leq 10^{-4}$ моль/л, то собирается смесь обоих ферментов даже в том случае, если K_1 выделяемого фермента много меньше $K_1(\text{II})$. Это следует из специфической формы изотермы адсорбции для аффинной хроматографии, поскольку теплота адсорбции предельно высока в условиях хроматографии.

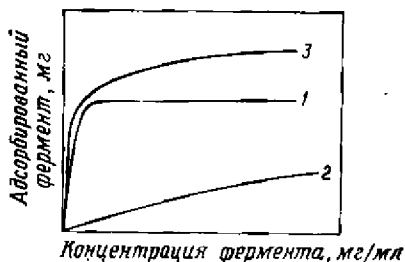


Рис. 5.1. Изотерма адсорбции для аффинной хроматографии.

1 — специфическая адсорбция; 2 — неспецифическая; 3 — суммарная.

Если $K_1(II)$ отличается от K_1 более чем в 50—100 раз, разделения можно достигнуть, например, при раздельном элюировании или при одноразовом процессе на нерастворимом аффинанте, количество которого точно соответствует содержанию наиболее сильно связываемого фермента, или при хроматографии, в которой равновесие между $[E(II) \cdot I]$ и $[E(I) \cdot I]$ достигается очень медленно.

Различия между ΔG_1 и ΔG_L обусловлены изменением стерической доступности аффинного лиганда после его иммобилизации, его модификацией при связывании с носителем, природой нерастворимой матрицы и т. п.

5.1. СТЕРИЧЕСКАЯ ДОСТУПНОСТЬ

Основное требование для успешной аффинной хроматографии состоит в том, что образование комплекса макромолекулярного вещества с аффинантом, ковалентно связанным с нерастворимым носителем, адекватно образованию их комплекса в растворе. Это требует прежде всего достаточного пространства, в особенности если речь идет о взаимодействиях высокомолекулярных веществ. Отсюда одним из наиболее важных требований, предъявляемых к нерастворимым носителям, является высокая пористость. В качестве примера можно рассмотреть сорбцию β -галактозидазы на сорбентах, приготовленных путем иммобилизации ингибитора *l*-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозида через углеводородную «ножку» к полидекстрановому гелю — сефарозе и к полиакриламидному гелю — биогелю Р-300 [31]. Содержание связанного ингибитора было почти одинаковым в обоих случаях, однако выделение β -галактозидазы аффинной хроматографией оказалось успешным только на сефарозе. Несмотря на высокую концентрацию ингибитора (50 мкмоль/мл), фермент не задерживался на биогеле Р-300, что, возможно, обусловлено чрезмерно объемистым тетрамером β -галактозидазы (молекулярная масса 540 000 [3]), который не входил в поры биогеля. Напротив, при выделении нуклеоиз стафилококков с молекулярной массой 17 000 [4] биогель Р-300 оказался подходящим носителем. Высокая степень пористости растворимого носителя необходима также при выделении веществ с относительно слабым сродством к иммобилизованному аффинту (константа диссоциации $\geq 10^{-5}$ моль/л). Концентрация связанного аффинанта, который легко доступен для выделяемого вещества, должна быть в этом случае очень высока для достижения сильного взаимодействия, которое смогло бы физически удерживать выделяемые вещества, движущиеся через колонку.

Влияние пористости геля на доступность иммобилизованного аффинного лиганда, необходимую для комплексообразования с комплементарной макромолекулой, показано Дин [18] изучили влияние степени пористост

на связывание иммобилизованным NAD^+ лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в смеси с сывороточным альбумином. На колонке, содержащей сильно сшитый сефадекс G-25 со связанным NAD^+ , обе дегидрогеназы и сывороточный альбумин появляются в

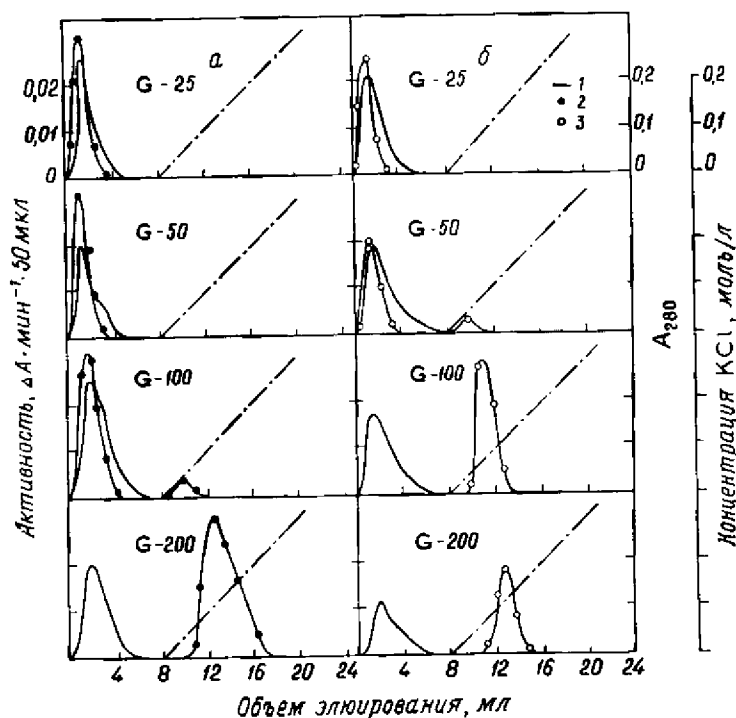


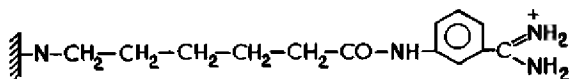
Рис. 5.2. Аффинная гель-фильтрация синтетических смесей (объем образца 50 мкл) бычьего сывороточного альбумина (0,8 мг) с лактатдегидрогеназой (1,85 E) (а) и малатдегидрогеназой (0,335 E) (б) [18].

Колонки (20×5 мм) с NAD^+ —сефадексом, имеющим различную пористость, уравнивались 10 мМ фосфатным буфером (pH 7,5); неадсорбируемый белок отмывался тем же буферным раствором; элюирование осуществлялось в градиенте концентрации (0–0,5 моль/л) KCl в том же буферном растворе (общий объем элюата 20 мл); 1— A_{280} бычьего сывороточного альбумина; 2—активность лактатдегидрогеназы; 3—активность малатдегидрогеназы.

удерживаемом объеме, поскольку иммобилизованный лиганд недоступен ферментам. В системе NAD^+ —сефадекс G-100 сорбируется малатдегидрогеназа, в то время как большая часть более высокомолекулярной лактатдегидрогеназы проходит через колонку вместе с сывороточным альбумином. Обе дегидрогеназы сорбируются на NAD^+ —сефадексе G-200. Взаимодействие фермента с иммобилизованным NAD^+ усиливается с увеличением пористости

геля, как это следует из концентрации хлорида калия, необходимой для элюирования ферментов, при использовании линейного градиента концентраций хлорида калия. Исключение дегидрогеназ из аффинных сорбентов, приготовленных из гелей с различным размером пор, использовано Лоу и Дином [18] в качестве микрометода для быстрого определения кажущихся молекулярных масс (метод известен как аффинная гель-фильтрация).

Другим примером существенного влияния пористости геля на емкость аффинного сорбента является зависимость количества сорбированного трипсина на 6 и 4%-ной агарозе, модифицированной *m*-аминобензамидином, от концентрации трипсина [24]. Пред-



полагая умеренные константы связывания, Нишикава и др. [24] рассмотрели с точки зрения адсорбционной теории гипотетическую систему, для которой на график наносили концентрацию образующегося комплекса фермент — лиганд [EL] в зависимости от концентрации фермента в сорбционном растворе [E] для трех фиксированных концентраций лиганда [L_0] (рис. 5.3, а). При нанесении [E] в логарифмическом масштабе получается сигмоидная кривая связывания. Были сделаны следующие допущения: 1) лиганд в геле ведет себя как соответствующая свободная молекула в растворе; в действительности же иммобилизация аффинного лиганда приводит к потере по крайней мере одной степени свободы в трансляционной энтропии; 2) концентрация лиганда в геле [L] полагается весьма близкой концентрации, измеренной в единице объема геля; 3) фермент свободно взаимодействует со всеми доступными лигандами, в то время как недоступные лиганды не влияют на связывающую способность фермента; 4) нерастворимый носитель не влияет на связь фермент — лиганд, кроме создания пространственных затруднений для доступности некоторых лигандов.

Из рис. 5.3, б видно, что количество связанного трипсина, определенное экспериментально в ходе исследования равновесного связывания, зависит от концентрации исходного раствора трипсина (в 0,05 М бицине, pH 8,15, и 0,25 М хлориде калия, 4 ч, 4°C), а также что только аффинный сорбент, приготовленный из 4%-ного геля агарозы, содержащего 19,2 мкэкв./мл *m*-аминобензамидина, характеризуется идеальным поведением. Этот носитель имеет существенно более высокую емкость при насыщении, чем аффинный сорбент, приготовленный из 6%-ной агарозы, содержащей

22,9 мкэкв./мл м-аминобензамидина; при высоких концентрациях трипсина он близок к 6%-ному гелю, содержащему 48,9 мкэкв./мл м-аминобензамидина. На рис. 5.3, б показана также емкость при насыщении для геля с высоким содержанием лиганда ($L_0 = 48,9$ мкэкв./мл), разбавленного равным объемом немодифицированной 6%-ной агарозы. Образующаяся концентрация лиганда

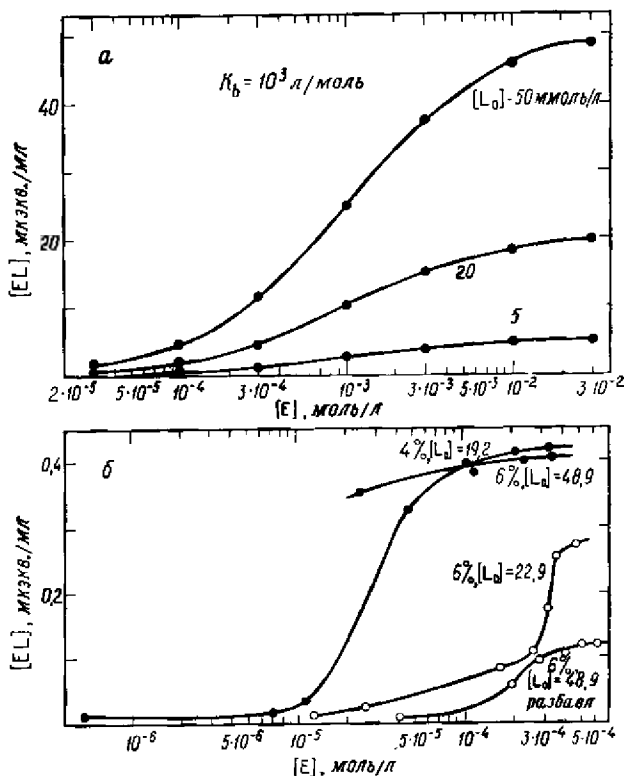


Рис. 5.3. Сопоставление идеального графика связывания фермента (а) и связывания трипсина на различных гелях (б) [24].

в геле равна, таким образом, $L_0 = 24,45$ мкэкв./мл. Однако кривая связывания существенно ниже, чем для 6%-ного геля с $L_0 = 22,9$ мкэкв./мл. Аффинные свойства сорбентов, разбавленных немодифицированными гелями, рассмотрены в разд. 5.3.

Конечно, встречаются случаи, когда пористость геля никак не влияет на взаимодействие макромолекул с иммобилизованным аффинантом; это системы с высоким сродством или с предельно крупными макромолекулами, когда только аффинные лиганды, иммобилизованные на поверхности гранул носителя, принимают

участие в комплексообразовании. Примером является аффинная хроматография полисом, рибосом, интактных клеток, органелл или мембранных фракций. В этих случаях вряд ли можно ожидать, что хроматографируемые частицы смогут проникать в поры гранул носителя.

Однако для достижения хорошей доступности иммобилизованных аффинных лигандов и связывающих центров биологических макромолекул даже высокая пористость нерастворимого носителя не достаточна. Химические группы аффинанта, принимающие участие во взаимодействии с макромолекулярным веществом, также должны быть достаточно удалены от поверхности нерастворимой матрицы, чтобы не возникало стерических затруднений.

Важность пространственного удаления низкомолекулярного ингибитора от поверхности жесткой матрицы для осуществления аффинной хроматографии показана Куатреказасом и др. [5] в одной из первых работ по успешному применению этого метода при выделении ферментов. На рис. 5.4 сопоставлены результаты аффинной хроматографии α -химотрипсина на сефарозе со связанным метиловым эфиром ε -аминокапронил-D-триптофана (а) и на сефарозе со связанным метиловым эфиром D-триптофана (б) с данными, полученными на незамещенной сефарозе (в). В первом случае (рис. 5.4, а) связанный ингибитор имеет высокое сродство к α -химотрипсину и фермент можно освободить из комплекса, только если понизить pH элюирующего буфера. При использовании 0,1 М уксусной кислоты (pH 3,0) фракция химотрипсина элюируется в виде острого пика и объем элюируемого химотрипсина не зависит от объема образца, нанесенного на колонку. Во втором случае (рис. 5.4, б), ингибитор, присоединенный непосредственно к сефарозе, имеет значительно более низкое сродство к выделяемому α -химотрипсину из-за стерических препятствий, поэтому для элюирования фермента не надо заменять буферный раствор, и, как можно видеть из рисунка, фермент элюируется в значительно большем объеме сразу после неактивного материала. Для подтверждения отсутствия в данных экспериментальных условиях неспецифической сорбции на носителе была проведена хроматография α -химотрипсина на незамещенном носителе (рис. 5.4, в).

Однако обнаружено, что хроматография химотрипсина на незамещенной сефарозе не дает достаточных доказательств отсутствия неспецифической сорбции. Напротив, Хофсти [12] показал, что сефароза с иммобилизованным метиловым эфиром ε -аминокапронил-D-триптофаном сорбирует, например, сывороточный альбумин или γ -глобулин полностью неспецифически.

Так, для ряда веществ было найдено, что и ферменты, и такие вещества, как иммуноглобулин, сывороточный альбумин и яичный альбумин, имеют гидрофобные области на поверхности своих молекул, благодаря чему они способны связываться с гидрофобной

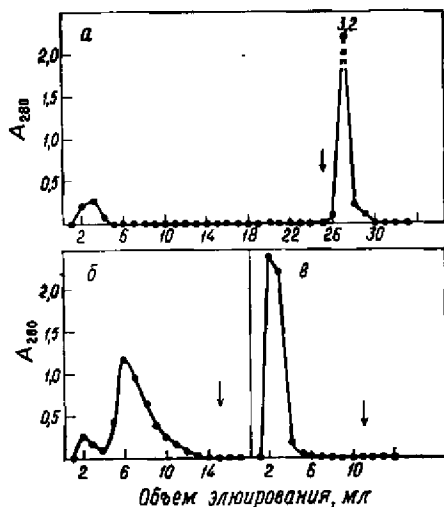
пространственной группой, такой, как гексаметилендиамин или ϵ -аминокапроновой кислотой. Это явление использовано для разделения ряда биологических макромолекул; метод известен как гидрофобная (аффинная) хроматография, которая детально рассмотрена в гл. 7.

Поскольку структура выделяемых веществ различна, нельзя дать общих рекомендаций относительно минимального расстояния

Рис. 5.4. Аффинная хроматография α -химотрипсина на колонках сефарозы с ингибитором [5].

Колонки (50×5 мм) предварительно уравнивались 0,05 М трис-HCl-буфером (pH 8,0). Образец (2,5 мг) наносился в 0,5 мл того же буферного раствора. Колонки элюировались при комнатной температуре, скорость потока 40 мл/ч; объем фракции 1 мл. Стрелки указывают замену элюента на 0,1 М уксусную кислоту (pH 3,0).

а — сефароза с присоединенным метиловым эфиром с аминокaproвил-D-триптофана; б — сефароза с присоединенным метиловым эфиром D-триптофана; в — немодифицированная сефароза. Первые пики на рис. а и б не обладали ферментативной активностью.

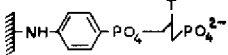
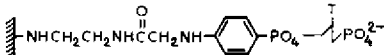
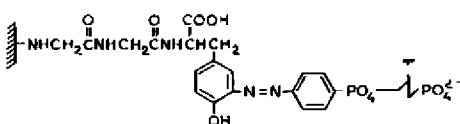
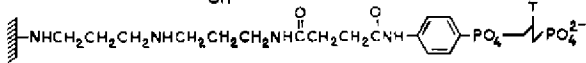


между аффинантом и поверхностью нерастворимого носителя. Однако аффинант должен располагаться на таком расстоянии от поверхности носителя, чтобы связь его с носителем не требовала деформации выделяемого вещества. Влияние удаленности аффинанта 3'-(4-аминофенилфосфорил)дезокситимидин-5'-фосфата от поверхности нерастворимого носителя (сефарозы 4В и биогеля Р-300) на емкость геля при хроматографии стафилококковой нуклеазы показано в табл. 5.1 [4]. Связь ингибитора непосредственно с матрицей обозначена как тип А, если же между ингибитором и поверхностью носителя введены цепи различной длины, то такие связи отнесены еще к трем типам (Б, В, Г).

Хинуэла и др. [10] провели хроматографию нескольких дегидрогеназ на N^6 - ω -аминоалкил-АМР — сефарозе. По концентрации хлорида калия, необходимой для освобождения дегидрогеназы из комплекса с нуклеотидом, может быть определена сила взаимодействия, оцениваемая как связываемость β . Влияние длины пространственной «ножки» на связываемость β некоторых дегидрогеназ на N^6 - ω -аминоалкил-АМР — сефарозе иллюстрирует рис. 5.5. Связываемость β двух изоферментов лактатдегидрогеназ быстро возрастает от $n = 2$ к $n = 5$ (где n — число CH_2 -групп в «ножке»).

Таблица 5.1

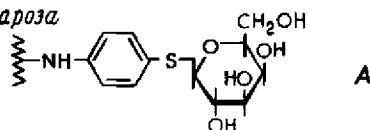
Емкость нерастворимых аффинантов, приготовленных путем присоединения 3'-(4-аминофенилфосфил)дезокситимидин-5'-фосфата к производным сефарозы 4В и биогеля Р-300, в аффинной хроматографии стафилококковой нуклеазы

Тип связи ингибитора с матрицей	Структура	Емкость (в мг нуклеа- зы на 1 мл геля) производных	
		сефарозы 4В	биогеля Р-300
А		2	0,6
Б		8	2
В		8	3
Г		10	

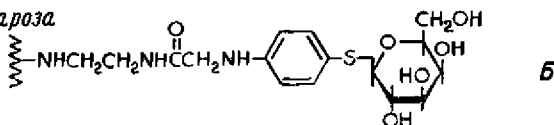
Если пространственная «ножка» еще более удлиняется, элюирование может быть усилено ударным введением небольших количеств NADH. Связывание малатдегидрогеназы, D-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы значительно слабее, чем лактатдегидрогеназы. Тем не менее для полимерных «ножек» с числом CH_2 -групп $n > 7$ незаметно, чтобы связывание фермента существенно изменялось. Кроме того, из рис. 5.5 очевидно, что для связывания лактатдегидрогеназы на иммобилизованном нуклеотиде в пространственной группе необходимы по крайней мере четыре метиленовых звена. Установлено, что использование протяженной «ножки» длиной по крайней мере 0,5 нм достаточно, чтобы преодолеть барьер, воздвигаемый микроокружением, создаваемым гидрофильным полимером [20]. Наличие такого барьера может быть обусловлено упорядоченным слоем молекул воды, окружающих скелет матрицы, и ограниченной диффузией в эту область или колебательными движениями решетки. В любом случае слой растворителя вблизи поверхности нерастворимого носителя представляет собой реальный барьер для взаимодействия макромолекулы с комплементарным аффинным лигандом, в особенности если взаимодействие проявляет слабую аффинность.

Однако из упоминаемых выше экспериментов все же не следует, что только расстояние аффинанта от матрицы — решающий фактор, определяющий силу связывания. Изучая гидрофобные пространственные группы О'Карра и др. [25–27] показали, что во многих случаях сорбция более зависит от гидрофобного связывания выделяемого вещества гидрофобной цепью, чем от образования биоспецифического комплекса. В качестве одного из наиболее часто цитируемого в статьях о влиянии пространственных групп примера, относящегося к аффинной хроматографии β -галактозидазы на носителях [31], можно рассмотреть следующие сорбенты:

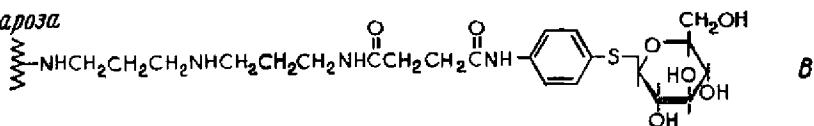
Агароза



Агароза



Агароза



Аффинный сорбент А, приготовленный путем привязки ингибитора — *p*-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозы — непосредственно к сефарозе, не связывает и не задерживает фермент в заметной степени. Прикрепление ингибитора через короткую «ножку» (~ 10 Å) дает сорбент Б, который очень мало задерживает фермент во время его пропускания через колонку. Для освобождения фермента из комплекса нет необходимости в изменении состава буферного раствора, и фермент выходит из колонки сразу же за неактивным белком. Только когда между ингибитором и поверхностью носителя помещена длинная «ножка» (~ 21 Å), образующийся сорбент В способен сильно связывать β -галактозидазу из различных бактериальных источников. Элюирование фермента происходит только после замены буферного раствора. Этот сорбент часто приводится в качестве примера очень эффективного специфического сорбента, приготовленного из ингибитора с относительно высокой константой ингибирования ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при относительно низкой концентрации аффинанта (0,6 ммоль/л). О'Карра и др. [26] приготовили сорбенты, ана-

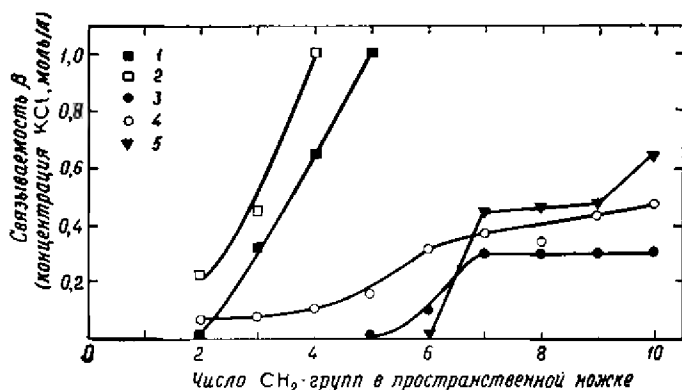
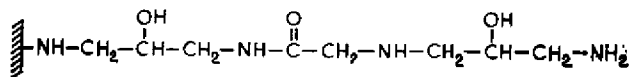


Рис. 5.5. Влияние длины пространственной «ножки» на связываемость некоторых дегидрогеназ на N^6 - ω -аминоалкил-АМР-сефарозе [10].

Колонки с модифицированными гелями (50×5 мм) предварительно уравнивались при 4°C 10 мМ буфером ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{KOH}$, pH 7,5), содержащим 0,02% азиды натрия. Объем образца фермент — белок, наносимого на колонку, равен объему колонки; после нанесения образца колонка промывалась несколькими объемами уравнивающего буфера в линейном градиенте концентрации KCl (от 0 до 1,0 моль/л; общий объем элюата 20 мл) с последующим «ударом» 200 мкл 5 мМ NADH , наносимого на колонку так же, как и смесь фермент — белок. Скорость потока 8,0—10,0 мл/ч; объем фракции 1,4 мл.

1 — 4 Е лактатдегидрогеназы; 2 — 4 Е лактатдегидрогеназы-М; 3 — 2 Е D-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 4 — 4 Е малатдегидрогеназы; 5 — 2,5 Е D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

логичные сорбенту В, в котором они заменили специфический ингибитор (β -тиогаляктозид) неспецифическим (α -глюкозидом или N-фенилглицином). Оба сорбента сохранили сильное сродство к β -галактозидазе. Но если использовалась гидрофильная цепь



в качестве пространственной группы для привязки β -тиогаляктозида, сорбция β -галактозидазы на таком сорбенте не была такой же сильной. Следовательно, сорбция β -галактозидазы на производном В определяется главным образом гидрофобными взаимодействиями с пространственной «ножкой». Гидрофобная природа этой пространственной группы, а также слабое влияние высоких концентраций солей также подтверждают эту точку зрения.

Мешающее влияние неспецифической сорбции в биоаффинной хроматографии обсуждается подробно в разд. 5.8 и 10.3. Неспецифической сорбции можно лучше всего избежать, если использовать гидрофильные пространственные группы, получение которых описано в разд. 8.3.

Гидрофильные пространственные группы предотвращают также и другие нежелательные последствия, имеющие место, когда

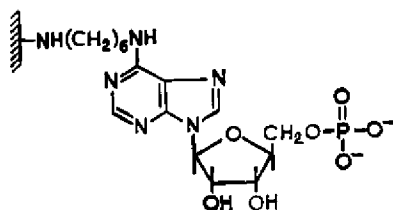
гидрофобный аффинант привязан к длинной подвижной гидрофобной цепи. При этом аффинант сам может взаимодействовать с пространственной группой и маскируется или окклюзируется гидрофобным окружением. Такая «конформационная окклюзия» может быть причиной недоступности иммобилизованного аффинанта для комплексообразования с выделяемым веществом. Практическим примером этого является аффинная хроматография *транс*-N-дезоксирибозилазы [13]. На сефарозе с иммобилизованным N⁶-L-амино-L-гексиладенином показано, что подвижность цепи обуславливает тесный контакт активной части лиганда с нерастворимым носителем и поэтому эффективное взаимодействие с ферментом не может осуществляться.

5.2. КОНФОРМАЦИЯ ПРИСОЕДИНЕННОГО АФФИНАНТА

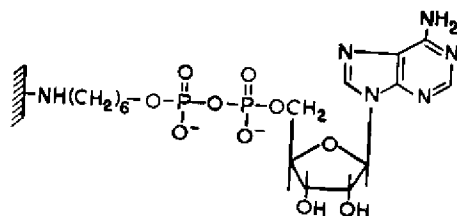
Специфические взаимодействия биологических макромолекул основаны на комплементарности связывающих участков. Например, высокая реакционная способность специфических субстратов обусловлена наиболее благоприятной конфигурационной и конформационной ориентацией групп субстрата относительно комплементарно расположенных групп или центров фермента.

Таким образом, чем сильнее взаимодействие субстрата и ингибитора с ферментом, тем выше комплементарность связывающих участков. Это справедливо не только в отношении пространственного расположения, но также и в отношении природы комплементирующих частей молекул. Однако способы привязки аффинного лиганда к нерастворимому носителю в значительной степени ограничены, потому что лиганд должен быть привязан той частью молекулы, которая не принимает участия в связывании. Кроме того, иммобилизация аффинанта не должна приводить к изменению его конформации или отрицательно влиять на природу его связывающих участков. Эффективность аффинного сорбента зависит от степени, до которой эти требования выполняются.

Существенное значение способа присоединения нуклеотидов к нерастворимому носителю для эффективности хроматографии зависящих от пиридиннуклеотида киназ и дегидрогеназ показано исследованиями Гарвея и др. [8]. Сорбент N⁶-(6-аминогексил)-АМР — сефароза содержит АМР, привязанную к сефарозе N⁶-адениновой частью,



в то время как в сорбенте P¹-(6-аминогексил)-P²-(5'-аденозин)пирофосфат — сефарозе АМР присоединена посредством 5'-фосфата:



О связывании различных дегидрогеназ и киназ на этих двух сорбентах упоминалось в предшествующей главе (табл. 4.2). Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и миокиназа связывались только P¹-(6-аминогексил)-P²-(5'-аденозин)пирофосфат — сефарозой, в то время как алкогольдегидрогеназа и глицерикиназа связывались только N⁶-(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозой. Лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, 3-фосфоглицераткиназа и пируваткиназа связывались обоими сорбентами, а гексокиназа и креатинкиназа не связывались ни одним из них. Эти результаты отражают природу фермент-нуклеотидных взаимодействий; можно сделать вывод, что в то время как свободная 5'-фосфатная группа существенна для связывания, например, алкогольдегидрогеназы или глицерикиназы, она играет совершенно другую роль при взаимодействии с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. В этом случае решающая роль принадлежит аденозиновой части аффинанта. Наиболее жесткие требования к связыванию гексокиназы и креатинкиназы приводят к тому, что эти ферменты не присоединяются ни к одному из этих сорбентов.

Высокомолекулярные аффинные лиганды обычно открывают больше возможностей для приготовления аффинных сорбентов. Ряд очень активных аффинных сорбентов получен при прямом присоединении белка к нерастворимому носителю (многочисленные примеры приведены в гл. 11, табл. 11.1). Однако в этом случае очень важным является условие, чтобы присоединение белка к нерастворимому носителю не приводило к изменению его нативной конформации.

В качестве иллюстрации рассмотрим пример иммуноадсорбции. Куатреказас [4] выделял инсулин на колонках с сефарозой, содержащей антитела против свиного инсулина, привязанных при рН 6,5 и 9,5. Как показано в разд. 8.2.4, белок привязывается к активированной бромцианом сефарозе аминогруппами в непротонированной форме. При понижении рН происходит также уменьшение числа связывающихся групп. Различие в рН привязки бел-

ка привело к тому, что в первой колонке (рН 6,5) связывалось почти 80% теоретически возможного количества инсулина, в то время как во второй колонке (рН 9,5) сохранялось только 7% сорбционной емкости по инсулину. Поскольку общее содержание привязанного аффинанта одинаково в обеих колонках, во второй должен находиться иммуноглобулин, неспособный эффективно связывать антиген. При большом числе привязанных аминокрупп, очевидно, происходит нарушение нативной третичной структуры. Даже при низких рН могут быть получены сорбенты, содержащие достаточно много активного белка, присоединенного к сефарозе, если увеличить количество бромциана при активации носителя и количество белка при его привязке.

5.3. КОНЦЕНТРАЦИЯ АФФИНАНТА НА МАТРИЦЕ

Теоретически выведенная взаимосвязь между количеством сорбируемого фермента, концентрацией аффинного лиганда и константами равновесия лиганд — фермент рассмотрена в гл. 3. Из рис. 3.3 следует, что для систем с низким сродством ($K_L = 10^{-3}$ моль/л) концентрация привязанного аффинного лиганда представляет собой критический параметр для получения эффективного сорбента. На рис. 5.6 показана аффинная хроматография глюкокиназы на 2-амино-2-дезоксид-β-глюкопиранозо-N-(6-аминогексаноил) — сефарозе при четырех концентрациях связанного аффинанта [15]. Видно, что оптимальная концентрация аффинного лиганда равна 3,75 мкмоль/г (рис. 5.6, б): при более низких концентрациях фермент не отделяется от неактивного материала, в то время как при более высоких концентрациях необходимо увеличить концентрацию глюкозы в элюате и при этом глюкокиназа выходит в большем объеме элюата. При концентрации 10 мкмоль/г глюкокиназа не может быть элюирована даже при высоких концентрациях глюкозы; она может быть снята только пропусканием 0,5 М хлорида калия.

Другим примером влияния концентрации аффинного лиганда является аффинная хроматография смеси лактатдегидрогеназы и сывороточного альбумина на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозе [8]. При высоких концентрациях лиганда (1,5 мкмоль 5'-AMP в 1 мл) для элюирования фермента необходимо введение NADH («удар»). При низких концентрациях (0,125 мкмоль 5'-AMP в 1 мл) десорбция фермента достигается просто градиентом концентрации (от 0 до 1 моль/л) хлорида калия. Дальнейшее уменьшение количества прикрепленного лиганда (0,025 мкмоль 5'-AMP в 1 мл) приводит к прогрессивному увеличению доли лактатдегидрогеназы, элюируемой исходным «уравновешивающим» буфером даже перед наложением линейного градиента солей. В то же время

белок, обладающий ферментативной активностью, незначительно отставал в своем движении по колонке от бычьего сывороточного альбумина. При концентрации лиганда $[5'-AMP] = 0,125$ мкмоль/мл, когда лактатдегидрогеназа количественно элюировалась при наложении градиента концентрации соли, 1 г сорбента связывал 0,1 нмоль фермента. Таким образом, для связывания лактатде-

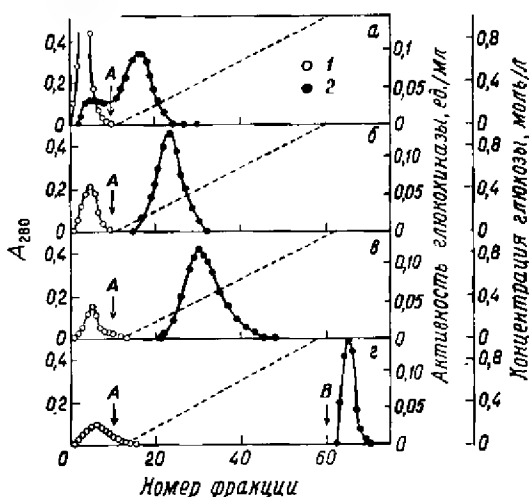


Рис. 5.6. Влияние концентрации лиганда на элюирование глюкокиназы глюкозой с 2-амино-2-деокси-D-глюкопиранозо-N-(6-аминогексаноил)-сефарозы [15].

Колонки (100×8 мм) предварительно уравнивались 20 мМ буфером (триэтаноламин + HCl, pH 7.0), содержащим 10 ммоль/л KCl + 4 ммоль/л ЭДТА + 7.5 ммоль/л MgCl₂ + 1 ммоль/л дитиотреитол + 5 об. % глицерина; скорость потока 20 мл/ч, объем фракции 3 мл. После нанесения глюкокиназы (2 мл, 2 Е/мл), очищенной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, колонка промывалась 25 мл уравнивающего буферного раствора. А — начало элюирования линейным градиентом, образуемым 75 мл уравнивающего буферного раствора и 75 мл 1 М глюкозы, приготовленной на этом же буфере. В — в элюирующий буферный раствор добавлялся KCl до концентрации 0,5 моль/л. Содержание присоединенного производного глюкокиназы (в мкмольях) в 1 г геля: а — 1,2; б — 3,75; в — 6,0; г — 10. Сорбент с заданной концентрацией лиганда готовился разбавлением геля с концентрацией лиганда 10 мкмоль/г незамещенной сефарозой. 1 — A₂₈₀; 2 — активность глюкокиназы. Пунктиром показано изменение концентрации глюкозы.

гидрогеназы используется только 0,1% прикрепленного аффинного лиганда. Близкое значение получено также при фронтальном хроматографическом анализе. При более низких концентрациях лиганда оно снижается до 0,025%. Как видно на рис. 5.7, а, кривая зависимости емкости N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозы по лактатдегидрогеназе от концентрации лиганда (равномерно распределенного в гранулах сорбента) имеет вид сигмоиды [6]. На основании этого можно сделать вывод, что для задержки лактатдегидрогеназы на колонке необходимо, чтобы рядом располагалось более одной молекулы иммобилизованного лиганда [8]. Сиг-

моидный вид кривой может говорить о кооперативном взаимодействии фермента с иммобилизованным лигандом. Это подтверждает идею, что более высокие концентрации лиганда ограничивают диссоциацию фермента с матрицы и удерживают его в комплексе с лигандом в больших количествах, чем это следует из обратимого равновесия. Такое кооперативное связывание отражается сигмоидной формой кривой зависимости количества связанного фермента от концентрации лиганда и наблюдается

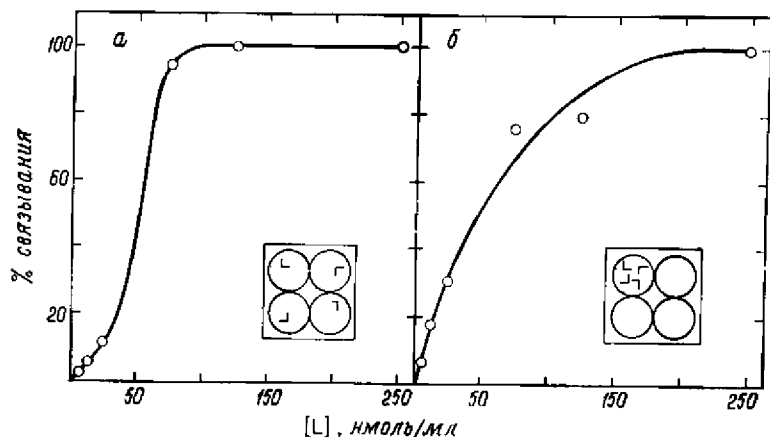


Рис. 5.7. Влияние распределения аффинного лиганда на емкость N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозы по лактатдегидрогеназе [6].

а — лиганд равномерно присоединен к сефарозе; б — лиганд разбавлен немодифицированной сефарозой.

только при равномерном распределении молекул лиганда в геле (рис. 5.7, а). В том случае, когда лиганд неравномерно распределен и изменение его концентрации в геле достигалось путем разбавления геля немодифицированной сефарозой, такая зависимость выражалась обычной гиперболической кривой насыщения (рис. 5.7, б).

Подобным образом Нишикава и др. [24] сопоставили гели, содержащие различные концентрации аффинанта, с учетом распределения лиганда в геле и рассмотрели как емкости по ферменту на единицу геля, так и аффинности гелей к ферменту. Концентрация лигандов в геле влияет на оба эти свойства, но не в одинаковой степени. Гранулы геля с высокой концентрацией аффинанта обладают высоким сродством и соответственно высокой емкостью в колонке. Если гель разбавить немодифицированной агарозой, концентрация лиганда внутри геля в модифицированных

Таблица 5.2

Взаимодействие миокиназы с P^1 -(6-аминогексил)- P^2 -(5'-аденозин)пирофосфат—сефарозой^a

Концентрация лиганда 5'-AMP, мкмоль/мл	β (концентрация KCl, ммоль/л) ^b	Количество связанного фермента (% к 5'-AMP)		
		% к 5'-AMP	E на 1 г сорбента	E на 1 мкмоль 5'-AMP
6,00	400	100	4,00	0,67
3,0	315	100	4,00	1,33
1,00	200	97,4	3,90	3,90
0,50	185	90,4	3,62	7,24
0,30	140	83,3	3,33	11,10
0,10	95	42,5	1,69	16,80
0,05	70	27,0	1,08	21,55
0,03	50	14,7	0,59	19,60

^a Образец фермента (100 мкл), содержащий миокиназу (4 E) и бычий сывороточный альбумин (1,5 мг), наносили на колонку (50×5 мм), содержащую 1 г P^1 -(6-аминогексил)- P^2 -(5'-аденозин)пирофосфат — сефарозу; сорбент разбавлялся до требуемой концентрации лиганда немодифицированной сефарозой 4B.

гранулах останется высокой и гель сохранит свою высокую аффинность. Однако теперь уже не все гранулы геля способны связывать фермент, и, следовательно, колоночная емкость понизится. Наконец, если гель равномерно модифицирован лигандом, но концентрация последнего низкая, низкими будут и аффинность, и колоночная емкость.

Изменения аффинности и емкости P^1 -(6-аминогексил)- P^2 -(5'-аденозин)пирофосфат — сефарозы при разбавлении разными количествами немодифицированной сефарозы на примере взаимодействия с миокиназой хорошо видны в табл. 5.2 [8]. Разбавление аффинным сорбентом ведет к уменьшению связываемости β , выраженной через концентрации хлорида калия, которые необходимы для элюирования фермента. Емкость сорбента, выраженная в единицах активности фермента, сорбированного на 1 мкмоль нуклеотида, возрастает при низких концентрациях нуклеотида, хотя абсолютная емкость на 1 г материала колонки с разбавлением уменьшается.

Зависимости связываемости β лактатдегидрогеназы от концентрации лиганда в N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозе, разбавленной незамещенной сефарозой до требуемой концентрации лиганда, и от той же концентрации в сефарозе, равномерно модифицированной N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP, близки [8]. Более сильная связываемость в случае сорбента, разбавленного незамещенной сефарозой, объяснена присутствием гранул геля, в которых концентрация лиганда остается идентичной той, которая была в исходном неразбавленном геле. В гелях, которые содержали равномерно распределенный лиганд, связываемость β лактатде-

гидрогеназы, малатдегидрогеназы и глицерокиназы линейно возрастает с увеличением концентрации N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР; иммобилизованного на сефарозе (рис. 5.8) [8].

Если концентрация лиганда N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР, иммобилизованного на сефарозе, и общее содержание лиганда постоянны, а меняется высота слоя геля при использовании разного диаметра колонок, связываемость β алкогольдегидрогеназы, а так-

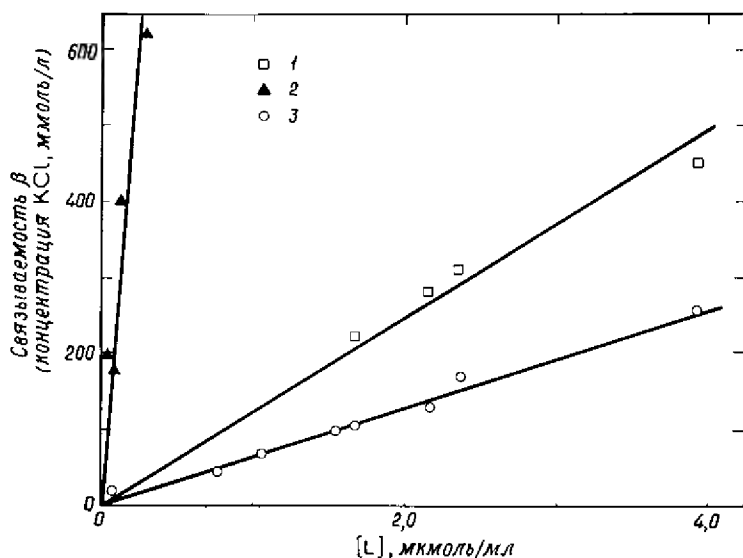


Рис. 5.8. Связываемость β малатдегидрогеназы (1), лактатдегидрогеназы из мышц сердца свиньи (2) и глицерокиназы (3) на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозе в зависимости от концентрации аффинного лиганда [8].

Образец (100 мкл) фермента (5 Е) наносился на колонку (50×5 мм) с 0.5 г сефарозы 4В, содержащей различные концентрации присоединенного N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР.

же глицерокиназы возрастает с увеличением высоты геля в колонке [21]. Если общее содержание аффинанта постоянно и колонки имеют один и тот же диаметр, связываемость β лактатдегидрогеназы и глицерокиназы на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозе прямо пропорциональна концентрации лиганда и, следовательно, в этом случае косвенно зависит от высоты колонки, уменьшаясь с уменьшением концентрации лиганда. Если же высота колонки увеличивается, в то время как концентрация аффинанта и диаметр колонки сохраняются постоянными, так что общее количество аффинного лиганда пропорционально высоте колонки, связываемость β лактатдегидрогеназы и глицерокиназы линейно зависит от высоты колонки. Емкость колонки в тех же условиях (т. е. при постоянной концентрации лиганда и постоян-

ном диаметре колонки) также линейно зависит от высоты колонки и, таким образом, от общего содержания лиганда в колонке.

Геометрия колонок, концентрация и общее содержание аффинного лиганда — вот три основных параметра, которые определяют и связываемость, и емкость носителя. Для систем с высокой аффинностью высота колонки с аффинным сорбентом, содержащим высокие концентрации лиганда, мало влияет; связываемость зависит от концентрации аффинанта, а не от высоты колонки. Это имеет практическое значение: колонки, содержащие высокие концентрации лиганда, можно использовать для концентрирования разбавленных растворов ферментов. Кроме того, в системах с высокой аффинностью, в которых элюирование адсорбированных макромолекул без денатурации затруднено, разбавление аффинного сорбента немодифицированным гелем или уменьшение концентрации лиганда может способствовать элюированию в более мягких условиях. В некоторых случаях, конечно, фермент различает только концентрацию лиганда в гранулах модифицированного геля, которая, однако, не меняется при разбавлении. В таких случаях трудности элюирования остаются даже после разбавления геля [11]. Для взаимодействий систем с низкой аффинностью очень важна геометрия колонки. Для разделения специфически адсорбированных белков от неадсорбированных наиболее выгодно использовать длинные колонки, а не короткие.

Конечно, аффинный сорбент с высокой концентрацией лиганда является нежелательным во всех случаях. На рис. 5.9 показана аффинная хроматография рецептора ацетилхолина из электрического органа *Torpedo californica* [30] на сефарозе, содержащей $2 \cdot 10^{-3}$ (рис. 5.9, а) и $0,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 5.9, б) $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Очевидно, что при уменьшении концентрации слабый, неспецифический ионообменник превращается в аффинный сорбент с высокой избирательностью. Последний был с успехом применен для очистки больших количеств основного α -бунгаротоксинсвязывающего компонента мембраны.

Снижение избирательности сорбента при выделении макромолекул после превышения некоторой критической концентрации лиганда (когда сорбент начинает действовать как неспецифический ионообменник) впервые описано Кальдероном и др. [16]. При выделении ацетилхолинэстеразы аффинный сорбент теряет свою специфичность, если концентрация лиганда возрастает от $0,15 \cdot 10^{-3}$ до $1,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Критические концентрации лиганда составляют, следовательно, $\sim 10^{-3}$ моль/л, что соответствует расстоянию между ближайшими соседними молекулами лиганда, равному ~ 100 Å, если предполагается равномерное распределение молекул лиганда внутри геля в узлах кубической решетки. Понятно, что при концентрации $< 10^{-3}$ моль/л молекулы лиганда находятся на достаточно больших расстояниях друг от друга, чтобы предотвра-

тить одновременное взаимодействие неспецифических белков более чем с одной заряженной группой. На таком свободно распределенном лиганде с заряженными группами могут поэтому сорбироваться только молекулы с «холинузнающим» центром, но не с другими неспецифическими отрицательно заряженными группами.

Другим нежелательным явлением в некоторых сорбентах с

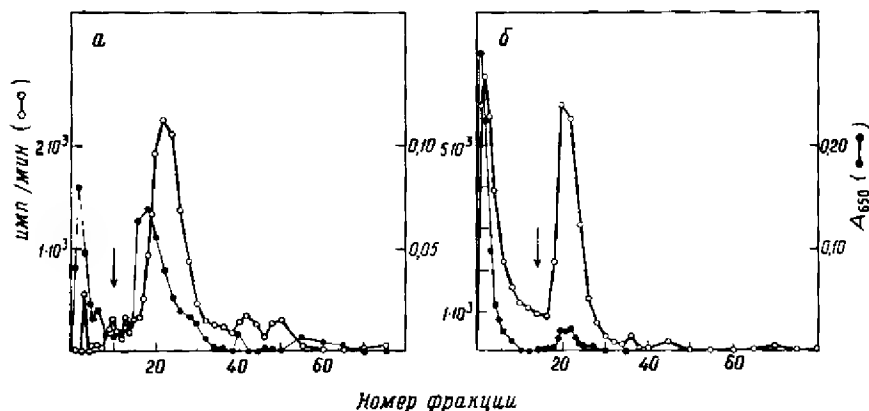


Рис. 5.9. Хроматография неочищенного экстракта мембраны из электрического органа *Torpedo californica* на сефарозе 2В, содержащей $2 \cdot 10^{-3}$ (а) и $0,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л (б) $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ [30].

Пастеровские пипетки наполнялись аффинными сорбентами (объем геля $\sim 1,5-2$ мл), которые уравнивались буферным раствором (10 мМ фосфат натрия (рН 7,4) + 0,1% эмульгонал). Небольшие количества неочищенного экстракта (0,6–3,0 мг, что соответствует 2–6 ед.) наносились на колонку и промывались тем же буфером. Стрелка указывает начало элюирования линейным градиентом концентрации (0–1 моль/л) NaCl (общий объем элюата 100 мл). Объем фракции $\sim 1,6$ мл; определялись содержание белка (A_{650}) и токсинсвязывающая активность (ИМП/МИН).

высокой концентрацией аффинного лиганда является слишком сильное взаимодействие с выделяемым веществом, что затрудняет его элюирование. Так, например, тщательный контроль концентрации лиганда имеет решающее значение для выделения глюкокиназы на агарозе со связанной N-(6-аминогексил)-2-амино-2-дезоксид-β-глюкопиранозой [14] (рис. 5.6).

5.4. КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКОВ, ВРЕМЯ УРАВНОВЕШИВАНИЯ И СКОРОСТЬ ПОТОКА

Концентрация подлежащего выделению вещества в растворе влияет по-разному в зависимости от того, происходит ли аффинное разделение в колонке или в статических условиях (одноразовый метод). Другим важным фактором является степень аффинности взаимодействий комплементарных участков выделяемого вещества

и аффинанта. Время уравнивания и скорость потока в колонке связаны с этим фактором.

В колоночной аффинной хроматографии достаточно сильное взаимодействие выделяемых веществ с иммобилизованным аффинным лигандом приводит к концентрированию вещества и его медленной миграции вниз по колонке. Этот процесс зависит от концентрации лиганда и почти не зависит от начальной концентрации свободных макромолекул. Например, в аффинной хроматографии глицерокиназы или лактатдегидрогеназы на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозе не наблюдалось влияния концентрации фермента на емкость, если концентрации ферментов прямо пропорциональны концентрациям нуклеотида или зависимость между ними близка к таковой [21]. Необходимые при этом требования заключаются в том, что комплементарные макромолекулы следует наносить на колонку в ненасыщающих количествах, а также подбирать скорость потока раствора [19].

Возможны две причины появления выделяемого белка в свободном объеме элюата при высоких скоростях потока в перегруженных колонках. Первая обусловлена процессом, известном как вторичное исключение. Скорость диффузии молекул в гель зависит не только от размера пор, но также и от соотношения между размером молекул и объемом пор. При нанесении на гель концентрированного раствора высокомолекулярного вещества с крупными молекулами одни из этих молекул будут сразу диффундировать в доступные поры, однако для молекул, пришедших позже, многие поры уже окажутся занятыми, поэтому вероятность диффузии в занятые поры понижается из-за уменьшения объема доступных пор. Это приводит к исключению вещества из пор, содержащих иммобилизованный лиганд, ставший недоступным из-за уменьшения объема пор. Вторая причина обусловлена стерическими затруднениями для последующих молекул, создаваемых уже адсорбированными молекулами белка. Глобулярный белок среднего размера, такой, как гемоглобин, покрывает площадь около $2500 \text{ \AA}^2$ [19], что само по себе создает пространственные затруднения.

Поскольку взаимодействие макромолекул с иммобилизованным аффинантом — процесс, зависящий от времени, на него влияет скорость потока в колонке и время установления равновесия. Во многих случаях адсорбционное равновесие достигается очень медленно. Для взаимодействия макромолекул с иммобилизованным аффинантом недостаточно простых столкновений молекул, а необходимы также точная ориентация связывающих участков или их конформационная подстройка. В табл. 5.3 показано влияние времени уравнивания на эффективность колонки с N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозой [21]. Если глицерокиназа и лактатдегидрогеназа уравновешены с сорбентом, то обе величины,

Таблица 5.3

Влияние времени уравнивания на эффективность колонки с N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозой^a

Время уравнивания, ч	Глицерокиназа				Лактатдегидрогеназа из мышцы сердца свиньи			
	количество связанной, %	β (концентрация KCl, ммоль/л) ^б	ширина пика, мл	ВЭТТ. ^б мм	количество связанной, %	β (концентрация KCl, ммоль/л) ^б	ширина пика, мл	ВЭТТ. ^б мм
1	26	20	7,0	0,42	100	360	18,5	1,50
20	51	50	6,0	0,25	100	355	11,2	0,52
67	59	150	5,6	0,17	100	490	13,8	0,76

^a Образец (100 мкл), содержащий фермент (5 Е) и бычий сывороточный альбумин (1,5 мг), наносился и промывался на колонке (34×5 мм) с N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозой (0,55 г влажного сорбента, содержащего 0,125 мкмоль/мл 5'-AMP).

^б ВЭТТ определяется как отношение высоты колонки к величине $16 (V_e/w)^2$, где V_e —объем элюирования от начала градиента концентрации KCl до центра пика фермента, w —ширина пика фермента у основания.

оценивающие эффективность колонки,—высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), и связываемость фермента β —возрастают со временем уравнивания вплоть до 67 ч. Вообще снижение ВЭТТ равносильно повышению эффективности сорбента [19]. В случае глицерокиназы процент связанного фермента также возрастает.

Из сопоставления ВЭТТ можно сделать важные практические выводы, а именно найти аффинный сорбент, характеризующийся не только хорошей связываемостью, но и лучшей избирательностью. Очевидно, таким образом Олсон и др. [28] обнаружили, что необходимо прекратить поток раствора в колонке за несколько часов перед специфическим элюированием. Время уравнивания не влияет на связываемость лактатдегидрогеназы на иммобилизованном NAD⁺ или на связываемость глицерокиназы на иммобилизованном АТР, если перед элюированием ферменты в течение 1,5 и 20 ч соответственно оставлять в контакте с иммобилизованными нуклеотидами [19]. Этот факт можно использовать для хранения ферментов, устойчивость которых зависит от присутствия субстратов или кофакторов.

Сам факт иммобилизации лиганда, а также ограничения, обусловленные наличием постоянной пленки на поверхности и внутри пор носителя, приводят к тому, что на кинетику реакции в целом влияют процессы диффузии. Диффузионное лимитирование, налагаемое природой и механизмом хроматографических процессов, можно разделить на три типа [19]:

1. Продольная диффузия, которая представляет собой классическую молекулярную диффузию Фика, создается концентрационным градиентом и может действовать как радиально, так и вдоль оси. В обычных условиях аффинной хроматографии она не имеет большого значения, но может стать важной при медленных скоростях потока в слабо взаимодействующих системах.

2. Диффузия Эдди может стать очень важным фактором при высоких скоростях потока. Она возникает в результате неравномерностей потока, вызываемых частицами геля в колонке. Если скорость достижения равновесия очень мала, то растворенные молекулы, движущиеся в быстрой струе, менее успешно взаимодействуют с иммобилизованным аффинантом, чем те, которые находятся в медленном потоке.

3) Ограниченная диффузия возникает, если молекулярная диффузия в порах матрицы затруднена из-за экранирования подхода макромолекул к прикрепленному аффинному лиганду. Экспериментально вклад этой диффузии можно определить с большим трудом, но для аффинной хроматографии на очень пористых носителях эти трудности становятся минимальными. На практике для достижения равновесных условий желательно, чтобы скорость потока была по возможности низкой. Например, при скорости потока 400 мл/ч для выделения стафилококковой нуклеазы на колонке объемом 20 мл небольшие количества нуклеазы появлялись в первом пике вместе с белковыми примесями, особенно если общая концентрация белков в образце была высока (20—30 мг/мл) [5]. Однако даже при такой высокой скорости потока нуклеаза полностью сорбировалась, если наносился менее концентрированный образец. Зависимость связывания лактатдегидрогеназы на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозе от скорости потока исследована Лоу и др. [21]. Было найдено, что увеличение скорости потока относительно мало влияет на сорбцию. При высоких скоростях потока эффективность колонки (ВЭТТ), а также связываемость β уменьшаются. Влияние скорости потока более заметно в небольших колонках, с которых часть белка с ферментативной активностью элюируется со свободным объемом. Влияния концентрации инертного белка (бывшего сывороточного альбумина) при высоких скоростях потока (67 мл/ч) также не обнаружено.

В одноразовом методе сорбции на аффинном сорбенте играет важную роль концентрация фермента в исходном растворе. В табл. 3.1 приведен процент насыщения иммобилизованного аффинанта сорбируемым ферментом при различных концентрациях фермента в исходном растворе [7]. Очевидна прямая пропорциональность. Такая же зависимость обнаруживается и на рис. 5.3, где приведены теоретические и экспериментальные данные для содержания комплекса фермент — иммобилизованный лиганд на аффинных сорбентах с различной концентрацией лиганда. Для

успешной сорбции необходимы высокие концентрации ферментов, особенно с сорбентами с низким содержанием присоединенного аффинного лиганда.

Данные, приведенные на рис. 5.10, а, показывают влияние концентраций лактатдегидрогеназы и глицерикиназы на емкость №-(6-аминогексил-5'-AMP) — сефарозы в статических условиях [21]. Процент связанного фермента возрастает с ростом его концентрации, причем наиболее предпочтительны для работы концентрации ≥ 2 ед./мл. Хотя связываемости β лактатдегидрогеназы

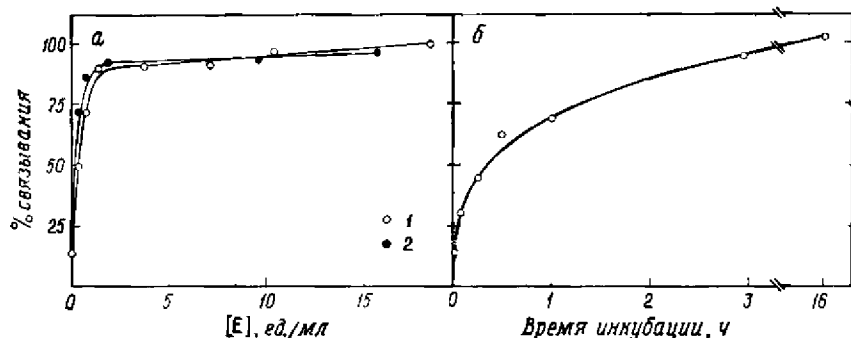


Рис. 5.10. Влияние концентрации фермента (а) и времени инкубации (б) на емкость №-(6-аминогексил-5'-AMP) — сефарозы по лактатдегидрогеназе (1) и глицерикиназе (2) в условиях одноразового метода [21].

Фермент, разбавленный уравнивающим буфером (10 мМ $(\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{KOH})$, pH 7.5) до подходящей концентрации (а), или 10 Е лактатдегидрогеназы, суспендированной в 100 мл уравнивающего буфера (б), инкубировались с №-(6-аминогексил-5'-AMP) — сефарозой (0,5 г влажного препарата сорбента, 1,5 мкмоль/мл 5' AMP) в смесителе Коултера при 4.5 °C. Через 30 мин (а) или определенные интервалы времени (б) инкубация приостанавливалась к после отставания сорбента (через 15 мин) удалялся супернатантный раствор. При пятиминутных периодах инкубации сорбент отмывался тремя порциями по 5 мл уравнивающего буфера, затем вновь суспендировался с 2,5 мл уравнивающего буфера и переносился в колонку (50×5 мм). Для элюирования через колонку пропускалось 11,0 мл уравнивающего буфера, содержащего линейный градиент концентраций (0—1,0 моль/л) KCl (общий объем элюата 20 мл). Ферменты определялись в промывках и элюатах колонки.

и глицерикиназы значительно различаются (относятся как 40 : 1), отношения процента связанного фермента к его концентрации фактически совпадают.

Влияние времени инкубации (уравнивания) на емкость №-(6-аминогексил-5'-AMP) — сефарозы при связывании лактатдегидрогеназы в статических условиях [21] показано на рис. 5.10, б. Связываемость фермента иммобилизованным нуклеотидом наиболее круто растет вначале, затем кривая становится более полой; 100% фермента связывается через 16 ч, а 50%-ное связывание достигается за 20 мин. Данные сорбции химотрипсина на NH_2 -сфере с присоединенными карбобензокси-D-фенилаланином приведены на рис. 3.1; они указывают, что равновесие достигается быстрее. На рис. 10.4 показано, как на достижение равновесия влияет разбавление.

5.5. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Адсорбция растворенного вещества из подвижной фазы стационарной фазой, — как правило, экзотермический процесс; согласно принципу Ле Шателье, повышение температуры должно приводить к сдвигу равновесия в направлении поглощения тепла. В условиях хроматографии повышение температуры сдвигает равновесие к более высоким относительным концентрациям в подвижной фазе, и высокие температуры приводят к более быстрой миграции через хроматографическую колонку. Вообще для ферментов с более экзотермической адсорбцией наблюдается большая зависимость последней от температуры [9].

Зависимость константы распределения K от абсолютной температуры T дается уравнением

$$K = e^{\Delta S^\circ/R} \cdot e^{-\Delta H^\circ/RT} = \text{const} \cdot e^{-\Delta H^\circ/RT}, \quad (5.3)$$

где ΔS° — стандартная энтропия, ΔH° — стандартная энтальпия адсорбции, а R — газовая постоянная. Для ферментов с различными энтальпиями адсорбции ($-\Delta H^\circ$) зависимость адсорбции от температуры может быть использована для разделения.

На примере сорбции алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы изучено влияние температуры на емкость №6-(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозы при двух концентрациях иммобилизованного нуклеотида [9]; результаты приведены на рис. 5.11. При низком содержании аффинанта (1,5 мкмоль/мл АМР) повышение температуры существенно влияет на количество фермента, связанного с аффинным сорбентом. Однако если концентрация связанного нуклеотида в сорбенте высока (4 мкмоль/мл АМР), то температура практически не сказывается на сорбции. Однако изменения концентраций иммобилизованного АМР никак не влияют на температурную зависимость связываемости β алкогольдегидрогеназы и глицерокиназы на №6-(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозе: во всех изученных примерах при повышении температуры связываемость β уменьшалась [9]. График Аррениуса для связываемости β глицерокиназы на иммобилизованном АМР линеен в интервале 0,5—35°C. Для сефарозы, содержащей 4,0 мкмоль/мл АМР, энергия адсорбции фермента составляет 20,2 кДж/моль (4,8 ккал/моль), а для сефарозы, содержащей 1,5 мкмоль/мл АМР, — 24,6 кДж/моль (5,9 ккал/моль).

Для аналогичного связывания алкогольдегидрогеназы наблюдается двухфазный график Аррениуса с энергиями адсорбции 24,6 кДж/моль (5,9 ккал/моль) и 58,8 кДж/моль (14,1 ккал/моль), соответственно выше и ниже температуры перехода (15°C). Причиной такого поведения может быть конформационное изменение фермента, индуцируемое температурой. Та же энергия адсорбции

глицерокиназы получается, если температура изменяется от 35 до 0,5°C. Из этих результатов следует, что даже длительное выдерживание колонок при повышенной температуре не изменяет их последующего хроматографического поведения при низкой температуре. Приведенные выше значения кажущихся энергий адсорбции рассчитаны без учета влияния температуры на ионную силу элюента. Если принять во внимание и этот фактор, то уточ-

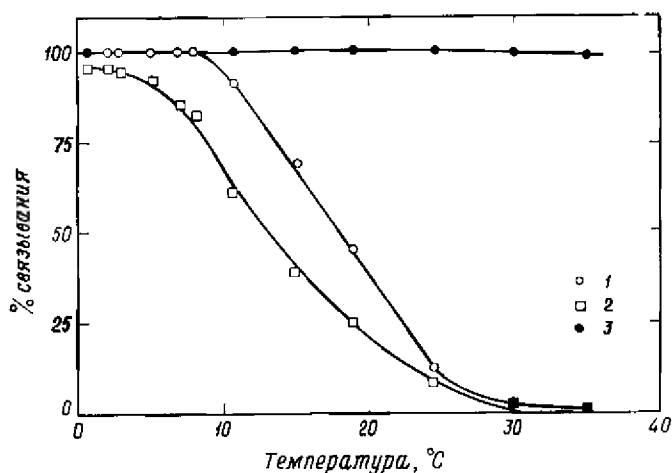


Рис. 5.11. Влияние температуры на емкость N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозы [9].

Образец (100 мкл), содержащий 5 Е фермента и 1,5 мг бычьего сывороточного альбумина, наносился на колонку (50X5 мм) с 0,5 г N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозой. Методику см. в подписи к рис. 1а. Емкость определялась по проценту ферментативной активности, задерживаемой сорбентом. Бычий сывороточный альбумин обнаружен в свободном объеме колонки. Концентрация иммобилизованного лиганда для дрожжевой алкогольдегидрогеназы составляла 1,5 мкмоль/мл АМР (1), для глицерокиназы 1,5 мкмоль/мл АМР (2) и 4,0 мкмоль/мл АМР (3).

ненная энергия адсорбции глицерокиназы составит 8,3 кДж/моль (2,0 ккал/моль).

Связывание лактатдегидрогеназы на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозе настолько сильно, что фермент нельзя элюировать даже 1 М КСl при 40°C. Однако для элюирования можно использовать линейный градиент концентрации NADH. На рис. 5.12 показан график зависимости концентрации NADH, необходимой для элюирования лактатдегидрогеназы, от температуры. С повышением температуры необходимая концентрация специфического элюирующего агента уменьшается, что отражается линейным графиком Аррениуса. Соответствующая энергия адсорбции составляет 54,6 кДж/моль (13,0 ккал/моль) [9].

На рис. 5.13 показано влияние температуры на связываемость β ферментов термофильного микроорганизма — алкогольдегидрогеназы и фосфофруктокиназы из *Bacillus stearothermophilus* — на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР — сефарозе [2]. Для упомянутых ферментов термофила связываемость β , напротив, первоначально

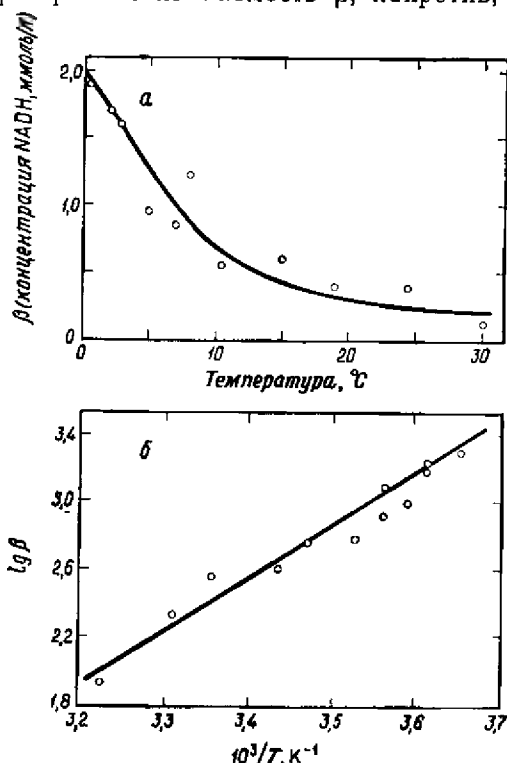


Рис. 5.12. Связываемость β лактатдегидрогеназы из мышцы сердца свиньи на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозе в зависимости от температуры [9].

Образец (100 мкл), содержащий 5 Е фермента и 1,5 мг бычьего сывороточного альбумина, наносился на колонку (50×5 мм) с 0,5 г N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР—сефарозой (1,5 мкмоль/мл АМР). *a* — методика см. в подписи к рис. 4.6; элюирование осуществлялось в линейном градиенте концентрации (0—5 ммоль/л) NADH (общий объем элюата 20 мл); *б* — график Аррениуса по тем же данным.

увеличивается с ростом температуры. Выше 50 °C уже происходит деструкция геля, которая обнаруживается по присутствию в элюате нуклеотида. Данные, приведенные на рис. 5.14, *a* и *б*, показывают, что связываемость β для обоих ферментов на иммобилизованном АМР также зависит от температуры [2]; на рис. 5.14, *в* дана зависимость от температуры точек перегиба кривых связываемости — рН (кажущиеся величины рК).

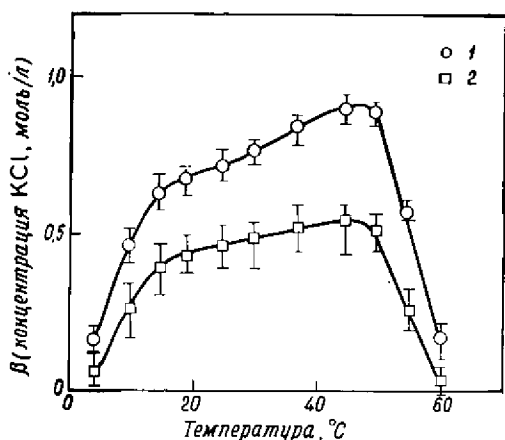


Рис. 5.13. Влияние температуры на связываемость β алкогольдегидрогеназы (1) и фосфофруктокиназы (2) на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР-сефарозе [2].

Проводился диализ экстракта фермента (0,5 мл), содержащего 81 Е фосфофруктокиназы, 20 Е или 18,7 мг/мл алкогольдегидрогеназы, против 10 мМ К-фосфатного буферного раствора (рН 6,8); затем раствор пропускался через колонку с замещенной АМР-сефарозой. Элюирование осуществлялось в линейном градиенте концентрации (0—1 моль/л) КСl (общий объем элюата 40 мл) в 10 мМ К-фосфатном буфере; скорость потока 0,4 мл/мин.

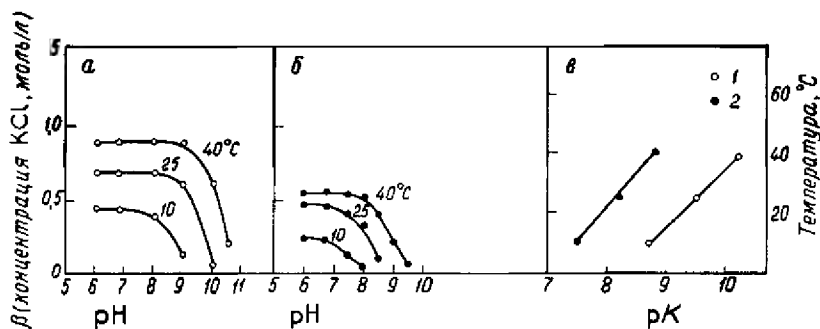


Рис. 5.14. Зависимость связываемости β алкогольдегидрогеназы (а) и фосфофруктокиназы (б) на N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР-сефарозе от рН и связь кажущихся pK (абсцисса в точках перегиба на рис. а и б) и температур связывания алкогольдегидрогеназы (1) и фосфофруктокиназы (2) (в) [2].

Условия см. в подписи к рис. 5.13; 10 мМ трис-фосфат доводился до требуемого рН при соответствующей температуре.

Влияние температуры на сорбцию и элюирование выделяемых аффинной хроматографией веществ рассмотрено далее (гл. 10). В заключение этого раздела следует подчеркнуть, что всегда следует помнить о влиянии температуры, поскольку воспроизводимые результаты можно получить, только если температура тщательно контролируется; особенно это касается аналитических приложений аффинной хроматографии.

5.6. ВЛИЯНИЕ pH И ИОННОЙ СИЛЫ

Каталитическое действие ферментов обычно ограничено узким интервалом оптимума pH, который зависит от ионизации и фермента, и его субстрата. Отклонение от этого интервала pH приводит к снижению как скорости ферментативной реакции, так и аффинности системы по субстрату. Ионные и гидрофобные взаимодействия с субстратом или ингибитором, осуществляющиеся в связывающем центре фермента, подвержены также значительному влиянию ионной силы. Поэтому и pH, и ионная сила — важные факторы при сорбции и десорбции. О влиянии pH и ионной силы на сорбцию химотрипсина на иммобилизованном бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланине уже упоминалось в гл. 3 (рис. 3.1). Касаи и Ишии [17] обнаружили увеличение константы диссоциации комплекса трипсина с иммобилизованным глицилглицил-L-аргинином от 0,23 до 0,33 мМ при добавлении 0,3 М хлористого натрия и до 0,75 мМ при добавлении 1,0 М хлористого натрия. Влияние взаимозависимости констант равновесий в ходе сорбции и десорбции при аффинной хроматографии уже было рассмотрено детально в гл. 3 и четко показано Грейвсом и Ву [7] (рис. 3.5).

Влияние pH на связывание лактатдегидрогеназы на аффинных сорбентах, таких, как N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — сефароза или 6-аминогексаноил-NAD⁺ — сефароза, показано на рис. 5.15 [22]. До pH 8 взаимодействие фермента с иммобилизованным лигандом не зависит от pH. В зависимости от природы иммобилизованного аффинанта при pH > 8 количество связанного фермента уменьшается. Для N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозы это уменьшение характеризуется кажущейся величиной $pK \sim 9,7$, а для 6-аминогексаноил-NAD⁺ — сефарозы $pK \sim 8,5$. Различие полученных pK может быть обусловлено неодинаковыми условиями приготовления аффинных сорбентов. В то время как первый из них готовится путем присоединения к сефарозе нуклеотида, уже снабженного пространственной группой N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP, во втором случае NAD⁺ присоединяется к 6-аминогексаноилу, уже закрепленному на сефарозе; в последнем случае возможно сохранение на носителе непрореагировавших заряженных групп. Винер и Шверт [32] показали, что связывание NAD⁺ лактатдегидрогеназой в свободном растворе управляется группой на поверхности фермента с $pK \sim 9,7$; это значение хорошо согласуется с тем, которое определено для N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — сефарозы.

Для проверки этого предположения Лоу и др. [22] сопоставили кривые титрования 6-аминогексаноил-NAD⁺ — сефарозы, немодифицированной сефарозы и 6-аминогексаноил — сефарозы, а также соответствующих производных целлюлозы; они продемонстрировали различное влияние носителя (см. рис. 8.1).

Если аффинный сорбент приготовлен из заряженного аффинанта, то при увеличении ионной силы раствора аффинность сорбента по комплементарной ему макромолекуле уменьшается. Сорбцию следует проводить из растворов с низкой ионной силой; однако этот процесс может вызвать нежелательные следствия; ко-

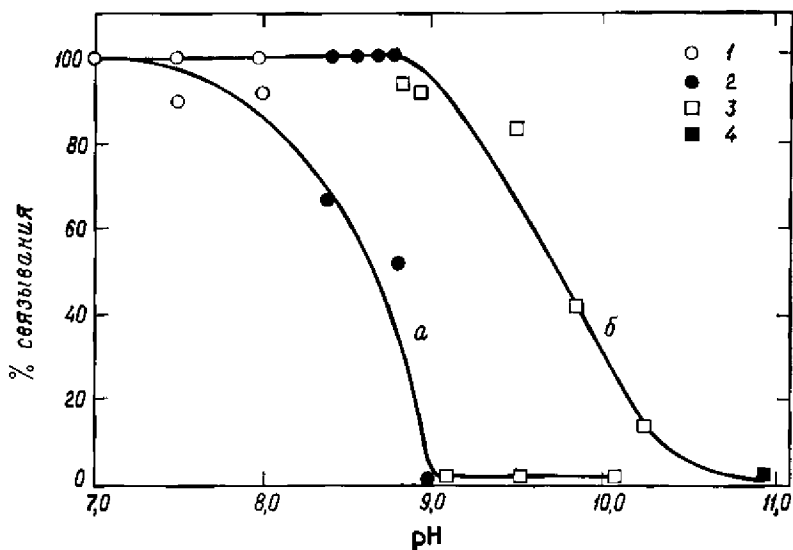


Рис. 5.15. Влияние pH на связывание лактатдегидрогеназы мышцы сердца свиньи ϵ -аминогексаноил-NAD⁺ —сефарозой (а) и N⁶-(6-аминогексил)-AMP —сефарозой (б) [22].

Результаты выражены через относительную связываемость при pH 6,5. а $\beta/\beta_{\text{макс}}$ при pH 6,5 и элюирования в линейном градиенте концентрации KCl (0—1 моль/л); б — процент ферментативной активности, элюируемой ударным введением NADH (200 мкл, 5 мМ). Использовались доведение до постоянной электропроводности (3,3 мОм-1) при помощи 1 М KCl буферные растворы: 1 — 10 мМ (KH₂PO₄+KOH), 2 — 10 мМ (трицин+KOH), 3 — 10 мМ (глицин+KOH) и 4 — 10 мМ K₂HPO₄. Образец, содержащий фермент (100 мкг) и бычий сывороточный альбумин (1,5 мг), наносился на колонку с 0,5 г N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозой (1,5 мкмоль/мл AMP), предварительно уравновешенную соответствующим буфером по методике, указанной в подписи к рис. 4.6.

личество примесных белков увеличивается; их сорбция, обусловленная взаимодействиями ионного характера с лигандом, также возрастает. Примером является аффинная хроматография ацетилхолинэстеразы [16], рассмотренная в разд. 5.3.

Применение для элюирования специфически сорбированных веществ градиента pH и градиента концентрации соли и влияние ионной силы и неспецифической сорбции рассмотрены далее в гл. 10.

5.7. ЭЛЮИРОВАНИЕ КОНКУРЕНТНЫМИ АФФИНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Теоретические основы элюирования ферментов конкурентными ингибиторами уже рассмотрены в гл. 3 (рис. 3.6).

Схема образования комплексов в системе, содержащей выделяемый фермент (E), специфически сорбируемый на иммобилизованном лиганде (L), и растворимый ингибитор (I), показана на рис. 5.16 [1]. Влияние ингибитора в подвижной фазе на движение фермента в колонке может быть трех типов:

1. *Конкурентное действие.* Если тройной комплекс ELI менее устойчив, чем двойной EI, при повышении концентрации ингибитора I увеличивается доля фермента в подвижной фазе, тем самым ферменты в колонке удерживаются слабее.

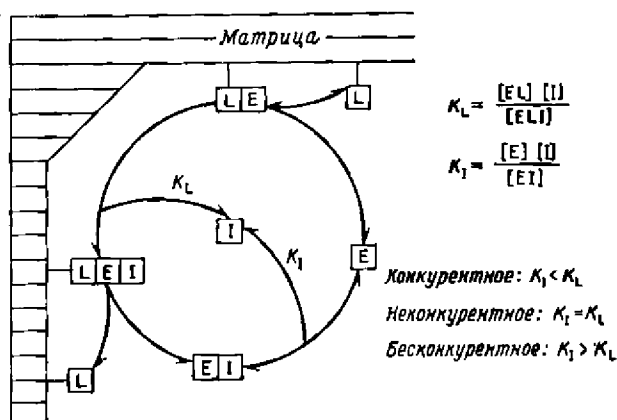


Рис. 5.16. Возможные компоненты системы, включающей фермент, ингибитор и матричный лиганд [1].

L — ковалентно привязанный к матрице аффинный лиганд, I — нефиксированный ингибитор, E — фермент

2. *Неконкурентное действие.* Если устойчивость тройного комплекса ELI близка к устойчивости двойного EI, связывание ингибитора I не влияет на сродство фермента к иммобилизованному лиганду и присутствие ингибитора не влияет на удерживание фермента.

3. *Бесконкурентное действие.* Если устойчивость тройного комплекса ELI выше, чем двойного EI, то присутствие свободного ингибитора I уменьшает долю фермента в подвижной фазе и повышает связываемость фермента. Если тройной комплекс ELI менее устойчив, чем двойной EL, увеличение концентрации свободного аффинного лиганда приведет к элюированию фермента.

В литературе можно найти много примеров элюирования конкурентными лигандами. В гл. 10 (рис. 10.5) описано выделение

трипсина и химотрипсина из панкреатических экстрактов, проводимое на сефарозе со связанным ингибитором трипсина. Химотрипсин снимается с колонки раствором конкурентного ингибитора — триптамина, а трипсин элюируется раствором бензамидина. В гл. 3 имеется указание на то, что для элюирования ферментов с аффинной матрицы раствором конкурентного ингибитора важно, чтобы концентрация последнего была выше, чем концентрация аффинанта, прикрепленного к матрице. Это справедливо в предположении, что оба (свободный и связанный ингибиторы) имеют приблизительно равное сродство к выделяемому ферменту. Можно также элюировать фермент раствором аффинанта, имеющего более высокое сродство. Во многих случаях элюирование специфически сорбированных ферментов буферными растворами, содержащими высокие концентрации конкурентного ингибитора, приводит к получению более разбавленных растворов фермента, чем при элюировании изменением pH или ионной силы раствора. Это явление особенно выражено в системах с высоким сродством, когда элюирование с аффинного сорбента может представлять собой зависимый от времени процесс даже при использовании высококонцентрированных растворов конкурентного аффинанта в буфере [19]. Диссоциация фермента из стационарной фазы — процесс первого порядка, и скорость зависит только от концентрации комплекса и не зависит от концентрации свободного конкурентного ингибитора. Свободный субстрат или ингибитор снижают тенденцию фермента к образованию нового ассоциата с иммобилизованным лигандом, поскольку фермент преимущественно переходит в растворимый комплекс; при этом предполагается, что субстрат или ингибитор находятся в достаточно высокой концентрации.

Если аффинность комплекса очень высока ($K_L \leq 10^7$ моль/л), для полной диссоциации комплекса требуется значительное время. Время, необходимое для ассоциации половины первоначально связанного с иммобилизованным аффинным лигандом фермента, называется временем полупревращения $t_{1/2}$, которое определяется выражением

$$t_{1/2} = \frac{\ln E_0/[E]}{k_{-1}} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} = \frac{0.693}{k_{-1}}, \quad (5.4)$$

где $[E]$ — концентрация свободного фермента, E_0 — начальная концентрация связанного фермента, а k_{-1} — константа скорости диссоциации комплекса $\left(E + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} EL \right)$.

Элюирование будет независимым от времени, если после введения растворимого ингибитора временно прекратить поток в колонке. Момент остановки потока определяется величиной k_{-1} , значение которой трудно найти, поэтому на практике этот момент подбирается более или менее эмпирически. Другой способ уско-

рения специфического элюирования состоит в одновременном изменении pH, ионной силы и температуры. Поскольку аффинность сорбентов снижается при повышении температуры, нагревание может существенно повлиять на элюирование конкурентным ингибитором. Действие различных элюентов на лактатдегидрогеназу, удерживаемую на AMP—сефарозе [28], показано на рис. 5.17.

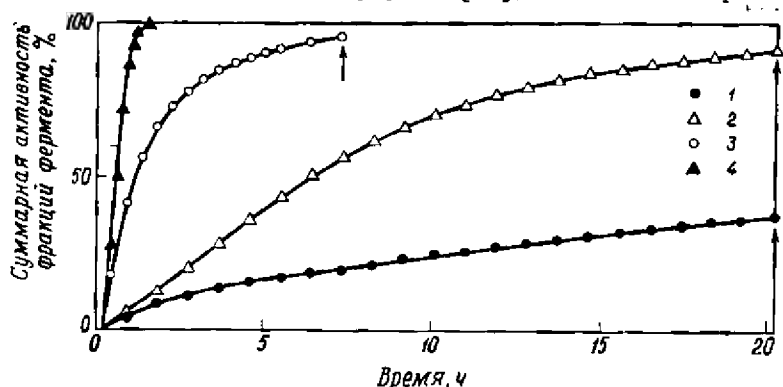


Рис. 5.17. Эффективность различных элюирующих систем для десорбции лактатдегидрогеназы из сердца быка, связанной на колонке (40×15 мм) с AMP—сефарозой (1,0 г влажного геля) [28].

Фермент (0,1 мг) в 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,5) наносился на колонку. Для элюирования использовались следующие буферные смеси: 1—0,5 мМ NAD^+ +0,5 мМ L-лактат; 2—0,5 мМ NAD^+ +0,5 мМ пируват; 3—0,5 мМ окисленный аддукт NAD^+ —пируват; 4—0,5 мМ NADH. Стрелки указывают ударное введение 2,0 мл 10 мМ NADH для обеспечения элюирования оставшегося связанного фермента. При расчете количества фермента учитывались поправки на ингибирующее действие. Объем фракции 5,5 мл; скорость потока 6 мл/ч.

В то время как элюирование лактатдегидрогеназы 0,5 мМ NADH происходит количественно за 1 ч, только 30% фермента элюируется через 20 ч раствором 0,5 мМ NAD^+ +0,3 мМ L-лактат.

5.8. НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЛИЯНИЯ

Эффективность аффинной хроматографии снижается в основном из-за неспецифической сорбции инертных веществ. Неспецифические эффекты, как правило, очень слабы и проявляются главным образом во взаимодействующих системах с низким средством.

5.8.1. Влияние на неспецифическую сорбцию ионной силы

До последнего времени основной причиной неспецифической сорбции считался ионный обмен. Как правило, полагали, что при исключении ионных групп из материала матрицы и введении пространственных групп мешающие эффекты могут быть преодолены. Конечно, во многих случаях аффинные лиганды сами имеют ионогенные свойства и могут связывать, осуществляя ионный обмен.

Работы О'Карра и др. [26] показали, однако, что наиболее часто причиной «мнимой аффинности» систем является неспецифическая сорбция на незаряженной пространственной группе или даже небиоспецифическая сорбция белков, обусловленная гидрофобными взаимодействиями. При близком рассмотрении становится очевидным, что эти гидрофобные взаимодействия могут быть полезны для разделения многих веществ; для этого типа хроматографии

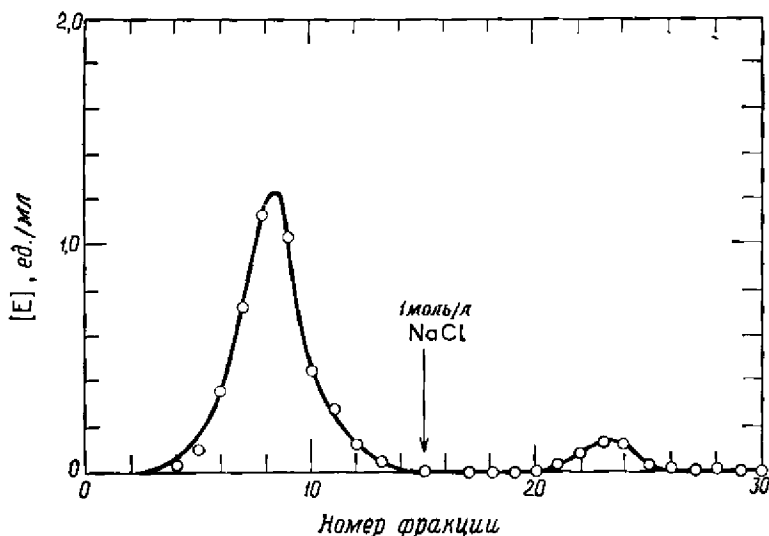


Рис. 5.18. Хроматография β -галактозидазы из *Escherichia coli* на сефарозе 4В, модифицированной 3,3'-диаминодипропиламином [23].

Образец (5 мл) с 0,5 мг фермента наносился на колонку (109×16 мм) при pH 7,5 в 0,05 М трис-НСl буфере, содержащем 0,10 моль/л NaCl и 0,01 моль/л $MgCl_2$. Скорость потока 20 мл/ч; отбор фракций осуществлялся через 3,5 мин.

введен термин «гидрофобная хроматография». Она более детально рассмотрена в разд. 7.1.

Морроу и др. [23] разработали полуколичественную теорию неспецифического связывания белков на замещенных хроматографических аффинных носителях, которое обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. В разд. 5.1 детально рассмотрено выделение β -галактозидазы из *Escherichia coli*, проводимое на сефарозе с прикрепленным ингибитором (*n*-аминофенил- β -D-тиогактопиранозидом) [31]. Активный сорбент получали присоединением ингибитора через пространственную группу, полученную из бис-(3-аминопропил)амин и янтарного ангидрида. Однако активность сорбента была значительно ниже, если эта пространственная группа обладала гидрофильными свойствами [26]. Робинсон и др. [29] использовали аффинный сорбент, при-

мененный вначале Стирсом и др. [31], для изучения влияния ионной силы раствора на очистку β -галактозидазы. Фермент связывался с сорбентом обратимо при ионной силе $\sim 0,05$. При более низкой ионной силе (0,01) происходит необратимое связывание фермента.

Учитывая эти данные, Морроу и др. [23] исследовали влияние ионной силы раствора на константу равновесия адсорбции и на константу скорости десорбции β -галактозидазы на сефарозе с присоединенным к ней бис-(3-аминопропил) амином. На рис. 5.18 приведены данные хроматографии β -галактозидазы на этом сорбенте в 0,05 М трис-HCl-буфере, содержащем 0,1 М хлорид натрия и 0,01 М хлорид магния (рН 7,5). Около 90% фермента, пропущенного через колонку, не задерживаются и только 10% остаются связанными в колонке посредством электростатических связей и могут быть элюированы растворами с высокой ионной силой, например 1 М хлористым натрием. На основании этих результатов можно сделать вывод, что в данных условиях аминная часть лиганда мало участвует в связывании фермента. При хроматографии β -галактозидазы в аналогичных условиях (единственное отличие состояло в том, что к 0,05 М трис-HCl-буферу не добавлялись соли) почти весь нанесенный фермент был неспецифически связан в колонке; 85% фермента десорбировалось при увеличении ионной силы буферного раствора добавлением 1 М хлористого натрия. Очень хорошие результаты получались, если связывание β -галактозидазы на замещенном геле проводилось при высокой ионной силе (1,8 М фосфатный буферный раствор), а последующее элюирование при помощи растворов с понижающимся линейным градиентом ионной силы.

5.8.2. Применение теории Дебая — Хюккеля при изучении зависимости константы равновесия адсорбции и скорости десорбции фермента с замещенных гелей от ионной силы*

Равновесие взаимодействия фермента Е с лигандом L, связанным на поверхности геля, приводящее к образованию фермент-лигандного комплекса, описывается уравнением (3.1)



Дальнейший анализ основан на модели, близкой теории Дебая — Хюккеля для растворимости белков или для взаимодействия ингибитора с активным центром [23]. Предварительным условием дальнейших рассуждений является требование, что фермент не должен обнаруживать никакого притяжения к поверхности геля. Это, например, не соблюдается для системы лизоцим — сефароза.

* Список обозначений см. на стр. 102.

Константу равновесия для диссоциации K согласно написанной выше реакции можно выразить через активности фермента a_E , лиганда a_L и фермент-лигандного комплекса a_{EL} :

$$K = \frac{a_E a_L}{a_{EL}} = \frac{c_E c_L}{c_{EL}} \cdot \frac{\gamma_E \gamma_L}{\gamma_{EL}}, \quad (5.5)$$

где γ_E , γ_L и γ_{EL} — коэффициенты активности, а c_E , c_L и c_{EL} — концентрации каждого компонента системы. В отличие от активности концентрацию c можно легко измерить, поэтому Морроу и др. [23] ввели концентрационную константу равновесия K_c :

$$K_c = \frac{c_E c_L}{c_{EL}}. \quad (5.6)$$

Уравнение (5.5) может быть переписано следующим образом:

$$\frac{K_c}{K} = \frac{\gamma_{EL}}{\gamma_E \gamma_L}. \quad (5.7)$$

Взаимодействия фермента с лигандом осуществляются благодаря и электростатическим, и гидрофобным силам. Коэффициент активности γ_i i -го компонента, проявляющего и электростатические, и гидрофобные свойства, согласно расширенной теории Дебая — Хюккеля, описывается уравнением

$$\lg \gamma_i = \frac{-AZ_i^2 \sqrt{I_s}}{1 + B \sqrt{I_s}} + K_i I_s, \quad (5.8)$$

где I_s — ионная сила раствора, Z_i — заряд i -го иона, K_i — константа, отражающая влияние гидрофобных взаимодействий. Константы A и B являются функциями диэлектрической проницаемости D , температуры раствора T (°C) и ионного радиуса a (Å):

$$A = 1,8246 \cdot 10^6 / (DT)^{3/2}, \quad (5.9)$$

$$B = 50,29a / (DT)^{1/2}. \quad (5.10)$$

Можно предположить, что при взаимодействии фермента с лигандом заряд фермент-лигандного комплекса равен сумме зарядов фермента и лиганда:

$$Z_{EL} = Z_E + Z_L \quad (5.11)$$

и что A и B постоянны для всех компонентов. Тогда уравнение (5.8) для коэффициентов активности всех компонентов можно написать в виде

$$\lg (K_c/K) = \frac{-2AZ_E Z_L \sqrt{I_s}}{1 + B \sqrt{I_s}} + K_0 I_s, \quad (5.12)$$

где

$$K_0 = K_{EL} - K_E - K_L \quad (5.13)$$

может принимать положительные, отрицательные или равные нулю значения. Таким образом, логарифм измеряемой константы равновесия $[\lg(K_c/K)]$ растет с увеличением ионной силы раствора I_s при ее низких величинах, но при высоких значениях ионной

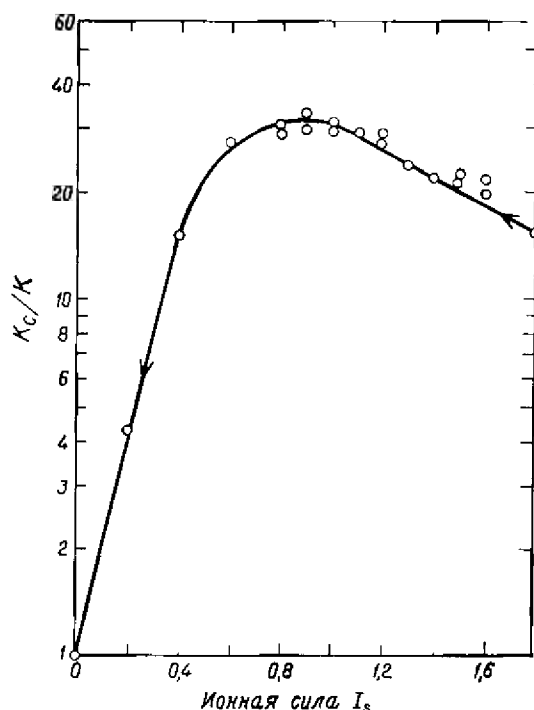


Рис. 5.19. Влияние ионной силы раствора на отношение констант равновесия для десорбции β -галактозидазы в К-фосфатном буферном растворе (рН 7,5) [23].

силы уменьшается (если $K_0 < 0$). Если $K_0 > 0$, для больших I_s величина $\lg(K_c/K)$ продолжает расти с увеличением I_s , однако если $K_0 = 0$, то $\lg(K_c/K)$ остается постоянным:

$$\lg(K_c/K) \approx \frac{-2AZ_BZ_L}{B} + K_0 I_s \quad (\text{при } B\sqrt{I_s} \gg 1). \quad (5.14)$$

Зависимость отношения констант равновесия от ионной силы для десорбции β -галактозидазы приведена на рис. 5.19; форма кривой находится в хорошем соответствии с предсказаниями, основанными на уравнении (5.12). Константы A и B , а также K_0 — обычно полуэмпирические параметры. Из рис. 5.19 видно, что линейный участок, предсказываемый уравнением (5.14), начинается при ионной силе > 0.8 . При более низких значениях ионной силы

связывание обусловлено преимущественно электростатическими силами. Это справедливо, если на K_c определяющее влияние оказывает первый член в правой части уравнения (5.12). Тангенс угла наклона прямолинейного участка кривой является константой гидрофобного связывания K_0 [уравнение (5.14)]. Продолжение прямолинейного участка отсекает на оси ординат значение $-2AZ_E Z_L / B$.

Подобные исследования с сывороточным альбумином и лизоцимом показали непрерывное увеличение константы связывания сывороточного альбумина при увеличении ионной силы. Для сывороточного альбумина даже при высокой ионной силе $K_0 > 0$, в то время как для лизоцима K_0 , очевидно, очень близка к нулю, о чем свидетельствует постоянство K_c при больших значениях I_s . Для того чтобы определить, будут ли совпадать величины K_c при достижении одной и той же ионной силы раствора по пути повышения или понижения ионной силы или в зависимости от этого будет иметь место установление нового равновесия, Морроу и др. [23] провели эксперимент, результаты которого показаны на рис. 5.20. Кривая 1 относится к ферменту, первоначально связанному при ионной силе 1,8, а кривая 2 — к ферменту, связанному при очень низкой ионной силе. Наблюдаемый гистерезис свидетельствует о различии, зависящем от направления достижения заданной ионной силы раствора. Тем не менее результаты обоих экспериментов согласуются с предсказаниями, сделанными на основании уравнения (5.12).

Если известна общая эффективная концентрация лиганда, способного связывать фермент (8 мкмоль в 1 мл геля), то можно определить расстояние между «ножками», на которых молекулы лиганда прикреплены к гелю; оно равно ~ 29 Å. Поскольку диаметр молекулы β -галактозидазы ~ 140 Å, можно сделать вывод, что приблизительно 19 «ножек» (пространственных групп) могут взаимодействовать с каждой молекулой белка. Это объясняет, почему в замещенных гелях настолько сильно проявляются неспецифические электростатические и гидрофобные взаимодействия. Если к этим пространственным группам привязан ингибитор, можно ожидать более специфических взаимодействий фермента с сорбентом при низком уровне модификации геля лигандом.

Используя постоянно перемешиваемый реактор и основываясь на расширенной теории Дебая — Хюккеля, Морроу и др. [23] показали, что адсорбция фермента более обратима при низких ионных силах раствора, в то время как при высокой ионной силе этот процесс становится по существу необратимым. С понижающимся линейным градиентом ионной силы десорбция фермента в постоянно перемешиваемом реакторе зависит от времени. Кроме того, показано, что присутствие других белков, например гемоглобина, не влияет на результаты.

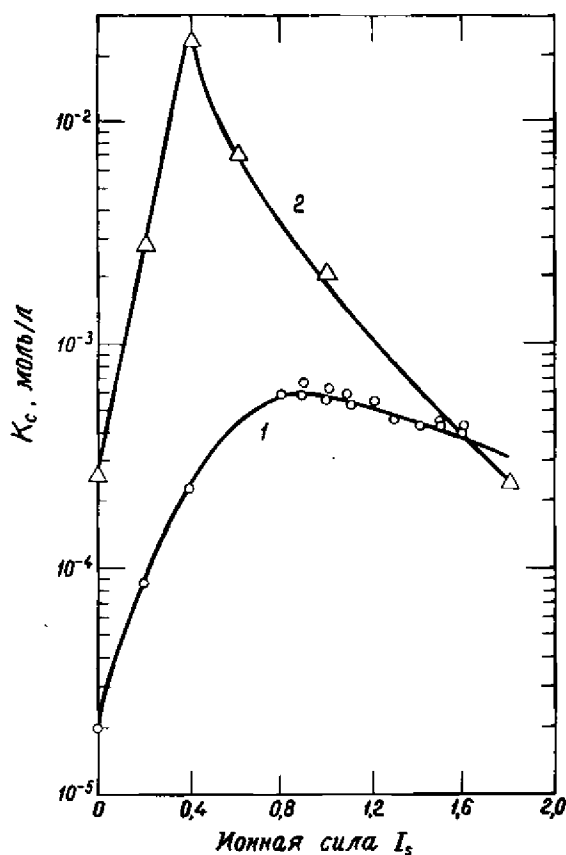
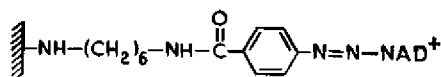


Рис. 5.20. Гистерезис зависимости K_d от ионной силы раствора для β -галактозидазы [23].

1 — первоначальное связывание при высокой ионной силе; 2 — при низкой ионной силе.

О'Карра и др. [26] изучали адсорбцию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на полимере



и обнаружили, что количество фермента, способного к элюированию, зависит от времени, в течение которого фермент находился в контакте с замещенным носителем. Выход фермента, элюируемого с помощью NAD^+ , понижается с увеличением времени, в течение которого фермент остается адсорбированным на геле перед

элюированием. На адсорбцию фермента не оказывают заметного влияния высокие концентрации хлористого калия, фермент элюируется исключительно с помощью 2 мМ NAD^+ , если элюирующий буферный раствор содержит 0,2 моль/л соли. В таких условиях фермент не сорбируется ни на носителе с прикрепленной пространственной группой, ни на биосорбенте после замены в нем лиганда NAD^+ на группу NADP^+ . Из этих результатов следует, что по своей природе сорбция является биоспецифической. Предполагается, что снижение количества элюируемого фермента при увеличении времени его контакта со специфическим сорбентом обусловлено небiosopecифической адсорбцией на гидрофобной пространственной «ножке», которое происходит после первоначального биоспецифического связывания на иммобилизованном NAD^+ . Корректность этой гипотезы подтверждается данными, полученными с аффинным сорбентом, у которого гидрофобная пространственная группа была заменена гидрофильной. Сорбент, приготовленный таким образом, сохранял свою высокую аффинность к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе и при элюировании раствором NAD^+ выход фермента был выше 90%, причем он почти не снижался, даже если перед элюированием колонка с сорбированным ферментом была оставлена на 1,5 ч. Такой эксперимент, проведенный с ферментом, сорбированным на носителе с гидрофобной пространственной группой, приводит только к $\sim 10\%$ -ному выходу фермента, элюируемого NAD^+ .

Хотя небiosopecифическая адсорбция [26] в общем нежелательна в аффинной хроматографии, описано много примеров, в которых такая сорбция приносила пользу, повышая аффинность слабых биоаффинных систем. В таких случаях подходящий выбор и тщательный контроль условий могут сохранить преобладание биоспецифической природы взаимодействия, должным образом усиленной небiosopecифическим взаимодействием, так что последнее не становится доминирующим. Такая «усиленная» биоаффинность очень близка специфической высокой биоаффинности, и фермент может быть элюирован только другим биоспецифическим лигандом. Для этого эффекта О'Карра и др. [26] ввели термин «составная аффинность».

Таким образом, многие факторы влияют на взаимодействие иммобилизованного лиганда с комплементарной молекулой. Как биоспецифическая, так и небiosopecифическая сорбция основана по сути дела на тех же электростатических и гидрофобных взаимодействиях и их комбинации. Вклад небiosopecифических взаимодействий можно лучше оценить, сопоставляя константы диссоциации комплекса выделяемой макромолекулы с иммобилизованным аффинным лигандом и с тем же лигандом в растворе, используемом для элюирования (гл. 4). Такая характеристика аффинной системы весьма необходима, особенно если аффинная

хроматография используется не только для целей выделения, но также и для изучения специфических взаимодействий, происходящих в биохимических процессах.

Список используемых обозначений

- A — константа в теории Дебая — Хюккеля
 a — ионный радиус (Å)
 a_E, a_L, a_{EL} — активность фермента, лиганда и фермент-лигандного комплекса соответственно
 B — константа в теории Дебая — Хюккеля
 c_E, c_L, c_{EL} — концентрация фермента лиганда и фермент-лигандного комплекса (моль/л)
 c_{L_0} — общая эффективная концентрация лиганда (моль/л)
 D — диэлектрическая проницаемость раствора
 E — фермент
 EL — фермент-лигандный комплекс
 I_s — ионная сила раствора
 K_i — константа гидрофобности для i -го компонента (например, K_E, K_L, K_{EL}, K_X)
 K — константа связывания при $I_s = 0$; см. уравнение (5.14)
 K_c — константа связывания; см. уравнение (5.6)
 K_0 — определяется разностью $K_{EL} - K_L - K_E$; см. уравнение (5.13)
 L — лиганд
 t — время (мин)
 Z_i — заряд i -го компонента (например, Z_E, Z_L, Z_{EL}, Z_X)
 γ_i — коэффициент активности i -го компонента (например, $\gamma_E, \gamma_L, \gamma_{EL}, \gamma_X$)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akanuma H., Kasuga A., Akanuma T., Yamasaki M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 45, 27—33 (1971).
2. Comer M. J., Craven D. B., Harvey M. J., Atkinson A., Dean P. D. G., Eur. J., Biochem., 55, 201—209 (1975).
3. Craven G. R., Steers Jr., E., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., 240, 2468—2477 (1965).
4. Cuatrecasas P., J. Biol. Chem., 245, 3059—3065 (1970).
5. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61, 636—643 (1968).
6. Dean P. D. G., Craven D. B., Harvey M. J., Lowe C. R., Advan. Exp. Med. Biol., 42, 99—121 (1974).
7. Graves D. J., Wu Y.-T., Methods Enzymol., 34, 140—163 (1974).
8. Harvey M. J., Lowe C. R., Craven D. B., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 335—340 (1974).
9. Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 353—357 (1974).

10. *Hipwell M. C., Harvey M. J., Dean P. D. G.*, FEBS Lett., **42**, 355—359 (1974).
11. *Hixson Jr. H. F., Nischikawa A. H.*, Arch. Biochem. Biophys., **154**, 501—509 (1973).
12. *Hofstee B. H. J.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **50**, 751—757 (1973).
13. *Holguin J., Cardinaud R.*, Eur. J. Biochem., **54**, 505—514 (1975).
14. *Holroyde M. J., Trayer I. P.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 1310—1311 (1974).
15. *Holroyde M. J., Cheshier J. M. E., Trayer I. P., Walker D. G.*, Biochem. J., **153**, 351—361 (1976).
16. *Kalderon N., Silman I., Blumberg S., Dudai Y.*, Biochim. Biophys. Acta, **207**, 560—562 (1970).
17. *Kasai K., Ishii S.*, J. Biochem. (Tokyo), **77**, 261—264 (1975).
18. *Lowe C. R., Dean P. D. G.*, FEBS Lett., **18**, 31—34 (1971).
19. *Lowe C. R., Dean P. D. G.*, Affinity Chromatography, Wiley, New York, London, 1974, pp. 272.
20. *Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Dean P. D. G.*, Biochem. J., **133**, 499—506 (1973).
21. *Lowe V. R., Harvey M. J., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 341—345 (1974).
22. *Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G.*, Eur. J. Biochem., **41**, 347—351 (1974).
23. *Morrow R. M., Carbonell R. G., McCoy B. J.*, Biotechnol. Bioeng., **17**, 895—914 (1975).
24. *Nishikawa A. H., Bailon P., Ramel A. H.*, Advan. Exp. Med. Biol., **42**, 33—42 (1974).
25. *O'Carra P., Barry S., Griffin T.*, Biochem. Soc. Trans., **1**, 284—290 (1973).
26. *O'Carra P., Barry S., Griffin T.*, Methods Enzymol., **34**, 108—126 (1974).
27. *O'Carra P., Barry S., Griffin T.*, FEBS Lett., **43**, 169—175 (1974).
28. *Ohlsson R., Brodelius P., Mosbach K.*, FEBS Lett., **25**, 234—238 (1972).
29. *Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D.*, Biochim. Biophys. Acta, **285**, 28—35 (1972).
30. *Schmidt J., Raftery M. A.*, Biochemistry, **12**, 852—856 (1973).
31. *Steers E., Cuatrecasas P., Pollard B.*, J. Biol. Chem., **246**, 196—200 (1971).
32. *Winer A. D., Schwert G. W.*, J. Biol. Chem., **231**, 1065—1083 (1958).

Выбор аффинных лигандов

6.1. ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ СОРБЕНТЫ И СОРБЕНТЫ С ГРУППОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Соединение является подходящим аффинным лигандом для выделения биологически активных веществ, если оно связывает эти вещества специфически и обратимо. Следовательно, поскольку природа биологически активных веществ очень различна, применяемые аффинные лиганды также могут быть представителями самых различных соединений. Их классификацию поэтому следует дать на основе биохимических функций, а не химической структуры.

Обзор аффинных лигандов, используемых для выделения ферментов, ингибиторов, кофакторов, антител, антигенов, агглютининов, гликопротеинов и гликополисахаридов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, транспортных и рецепторных белков, гормонов и их рецепторов, липидов, клеток, вирусов и других веществ дан в гл. 11 (табл. 11.1).

В этот обзор включены также аффинные лиганды с очень узкой специфичностью. Например, если к носителю прикрепить ингибитор, специфичный для единственного фермента, образующийся сорбент также будет специфичен только для данного фермента. Однако для использования специфических лигандов необходимо проводить различные и часто очень трудоемкие синтезы сорбента для каждого разделения. Не все аффинанты, которые подходят для комплементарного связывания макромолекул, имеют также подходящие функциональные группы для их прикрепления к нерастворимому носителю. Эти группы должны быть предварительно введены в аффинный лиганд, так же как и подходящей длины пространственная «ножка», необходимая главным образом для низкомолекулярных аффинных лигандов (она позволяет осуществлять их специфические взаимодействия с сорбируемым веществом). Практическая полезность специфических сорбентов возрастает, если для их приготовления вместо узко специфических лигандов использовать так называемый «общий лиганд» [37]. Очевидно, что матрица с групповой специфичностью, содержащая общий лиганд, проявляет аффинность к большой группе биологических макромолекул. Например, ферменты метаболизма аспарагиновой кислоты обнаруживают групповую специфическую

сорбцию на N-(ω -аминогексил) L-аспартат — сефарозе. На таком иммобилизованном аффинном лиганде могут быть сорбированы аспарагиназа, аспартаза, аспартат- β -декарбоксилаза и аспарагиназа, модифицированная тетранитрометаном [54].

Для аффинных лигандов с групповой специфичностью каждый индивидуальный фермент не обязательно различает один и тот

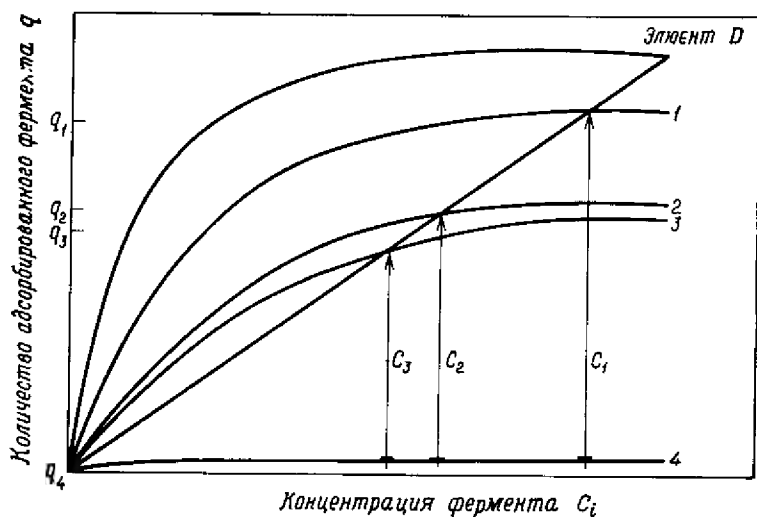


Рис. 6.1. Изотерма адсорбции для четырех (1, 2, 3 и 4) ферментов, взаимодействующих с одним и тем же иммобилизованным аффинным лигандом [35].

же участок иммобилизованного лиганда и взаимодействует с ним одинаковым способом. Так, например, если лиганд является общим для нескольких ферментов и если он может быть иммобилизован различными способами, данные аффинной хроматографии могут помочь в понимании природы взаимодействия каждого индивидуального фермента с прикрепленным аффинным лигандом. Различия в связываемости для ряда дегидрогеназ и киназ на 5'-AMP, присоединенном к сефарозе (см. табл. 4.2), показывают также, что для взаимодействия с ферментом должна быть доступна либо свободная фосфатная группа, либо свободная аденозиновая часть аффинного лиганда. Фосфатная группа нуклеотида играет существенную роль при связывании, например, алкогольдегидрогеназы или глицерокиназы; напротив, при взаимодействии нуклеотида с миокиназой или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой уже аденозиновая часть лиганда играет эту роль.

Серьезным ограничением для применения в аффинной хроматографии общих лигандов является их низкая избирательность.

Поэтому для разделения сложной смеси ферментов, которые могут сорбироваться, необходимы дополнительные средства.

Если иммобилизованный аффинный лиганд обнаруживает сродство более чем к одной комплементарной молекуле, это отражается на специфической форме изотермы адсорбции. На рис. 6.1 даны примеры изотерм адсорбции для четырех ферментов, каждый из которых обнаруживает индивидуальное сродство к иммобилизованному аффинному лиганду [35]. Фермент 1 обладает очень высоким сродством к специфическому сорбенту с константой диссоциации 10^{-7} — 10^{-8} моль/л. Ферменты 2 и 3 обладают меньшим сродством к сорбенту с константами диссоциации $\sim 10^{-5}$ моль/л, а аффинность фермента 4 оценивается константой диссоциации $> 10^{-3}$ моль/л.

Можно записать уравнение изотермы адсорбции Лэнгмюра в обобщенной форме:

$$q_i = \frac{k_1 k_2 C_i}{1 + k_1 C_i}, \quad (6.1)$$

где q_i — доля адсорбированного вещества i , C_i — концентрация сорбируемого вещества i , а k_1 и k_2 — константы. При низких концентрациях C_i уравнение (6.1) сводится к $q_i = k_1 k_2 C_i$, а при высоких C_i — к $q_i = k_2$. В общем виде

$$q_i = f(C_i)^n, \quad (6.2)$$

где $0 \leq n \leq 1$. Отсюда, если концентрация лиганда достаточно высока, так что емкость сорбента не является лимитирующим фактором, доля q_i адсорбированного вещества i зависит от его концентрации в подвижной фазе C_i , а не от его сродства к прикрепленному аффинному лиганду. Для образца, содержащего эквимолярные количества четырех ферментов, доля каждого адсорбированного фермента — q_1 , q_2 , q_3 и q_4 . При вытесняющей хроматографии с помощью сорбирующегося конкурирующего элюента с концентрацией D при элюировании ферментов 1, 2 и 3 их концентрации в элюате равны C_1 , C_2 и C_3 . Фермент 4 появится в элюате перед выходом вытесняющего конкурирующего сорбирующегося элюента, потому что его изотерма адсорбции не пересекает прямую концентрации этого элюента (рис. 6.1). Фермент с высоким сродством не вытесняет менее сильно связываемый фермент, даже если после начальной сорбции продолжать добавлять фермент с высоким сродством. Только когда емкость сорбента превзойдена, то в элюате в объеме колонки появятся ферменты как с низкой, так и с высокой аффинностью, а не только ферменты с низким сродством. Это особенно важно помнить при разделении ферментов, обнаруживающих сродство к общим лигандам.

Иногда перед адсорбцией на специфическом сорбенте бывает необходимо освободиться от белков-примесей путем предварительного фракционирования. Если изменить условия адсорбции, такие, как рН, ионную силу, температуру, скорость потока и диэлектрическую проницаемость, можно избирательно исключить некоторые ферменты. Более того, для предотвращения адсорбции некоторых из них можно добавить в раствор ингибитор или другие лиганды. Используя носитель с порами малого размера, можно исключить белки с высокой молекулярной массой. Повысить избирательность можно также, применяя специфическое элюирование. Специфические ингибиторы или субстраты могут быть применены для избирательного элюирования индивидуальных ферментов. В гл. 10 приведены примеры разделения смесей ферментов на сорбентах с групповой специфичностью; для выделения индивидуальных веществ применялись градиенты рН, ионной силы или температуры.

На избирательность аффинных лигандов может влиять также природа нерастворимого носителя [20]. Протеолитические ферменты, пришитые к отрицательно заряженному сополимеру малеиновой кислоты и этилена, сорбируют только те ингибиторы, изоэлектрическая точка которых $< 4-5$. Если сильный отрицательный заряд цепи сополимера нейтрализовать, присоединив, например, гексаметилендиамин и диметилендиамин, образующееся полиамфотерное производное становится пригодным для выделения ингибиторов даже с более низкими изоэлектрическими точками.

Как это детально показано в разд. 6.3, антитела проявляют высокое сродство к соответствующим антигенам и наоборот. Трудности их освобождения из комплексов обусловлены именно этим сильным взаимодействием. Использование сильных хаотропных элюентов в иммуноаффинной хроматографии можно избежать путем химической модификации иммобилизованных аффинных лигандов [39]. Например, элюирование антиглобулиновых антител из колонки с иммобилизованным глобулином может быть осуществлено в мягких условиях, если частично нарушить пространственную комплементарность к связывающему участку антитела путем избирательной модификации гормона, например реакцией с 2-окси-5-нитробензилбромидом, тетранитрометаном или перекисью водорода.

О'Карра [43] рекомендует различать аффинные системы с небольшими лигандами и с макролигандами. Низкомолекулярные синтетические лиганды предпочтительнее главным образом благодаря их стабильности и лучшей доступности. Специфические сорбенты, приготовленные из них, обычно лучше охарактеризованы, потому что эти лиганды присоединяются к носителю определенными функциональными группами. Для улучшения стериче-

ской доступности этих лигандов вводят пространственную группу, в большинстве случаев между ними и поверхностью нерастворимого носителя. В качестве высокомолекулярных аффинных лигандов используются преимущественно белки или нуклеиновые кислоты, которые часто подвержены денатурации, приводящей к необратимой потере активности, и для них обычно метод присоединения к носителю не дает возможности точно знать место привязки.

6.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ, ИНГИБИТОРОВ И КОФАКТОРОВ

Аффинными лигандами для выделения ферментов могут быть конкурентные ингибиторы, субстраты и их аналоги, продукты, кофакторы и аллостерические эффекторы, а также антитела или соединения, которые содержат ионы металлов или SH-группы, (см. табл. 11.1).

В качестве примера использования конкурентного ингибитора на рис. 6.2 показано выделение химотрипсина из неочищенного экстракта поджелудочной железы; в качестве специфического сорбента использован N-бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланин, присоединенный к сферону через гексаметилендиамин [55]. Элюирование фермента осуществлялось либо путем изменения pH (рис. 6.2, а), либо специфически раствором конкурентного ингибитора трипсина (рис. 6.2, б). Для того чтобы получить химотрипсин из его комплекса с растворимым ингибитором трипсина, необходимо дополнительно использовать гель-хроматографию в кислой среде. Результаты (количество и активность химотрипсина) фактически совпадают с результатами, получаемыми при простом лиофильном высушивании материала из пика 2 (рис. 6.2, а).

Для многих ферментов, которые специфичны к ДНК и субстратом которых является однонитевая ДНК, последняя может быть использована в качестве аффинного лиганда (см. табл. 11.1). Очень эффективным является, например, сорбент ДНК — агароза [49]. Этот сорбент характеризуется высокой концентрацией ДНК, и неспецифическая сорбция на нем может быть сведена до минимума выбором подходящих условий. На рис. 10.9 приведен пример использования ДНК — агарозы для выделения РНК-полимеразы. Другими примерами использования субстратов для выделения ферментов является аффинная хроматография цитохром-оксидазы на сефарозе с иммобилизованным цитохромом с [44] и протоколлагае-пролингидроксилазы на биогеле А с восстановленным и карбоксиметилированным коллагеном [4]. В очень многих реакциях, катализируемых ферментами, функцию косубстратов выполняют коферменты. Такие ферменты должны содержать по

меньшей мере два специфических связывающих участка — один для кофермента, не являющийся общим для всех лигандов, и один или несколько для субстрата. Последний центр связывания, следовательно, должен определяться природой субстрата и катализируемой реакцией. Поэтому иммобилизованные коферменты

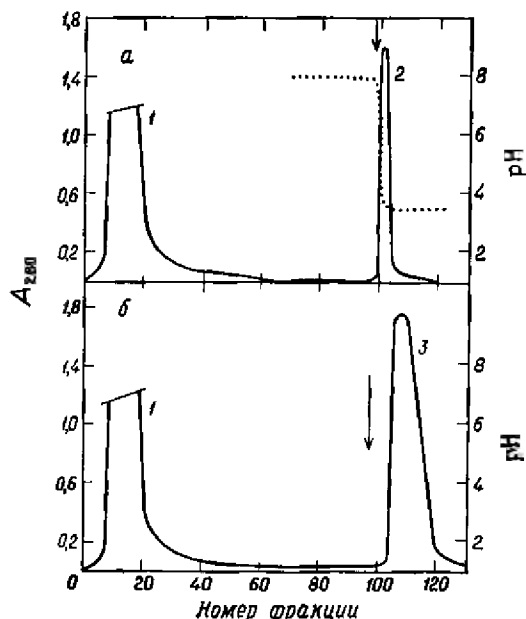


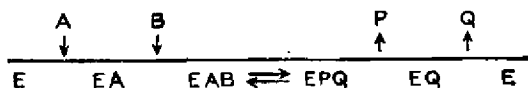
Рис. 6.2. Хроматография неочищенного панкреатического экстракта на Z-Gly-D-Phe-NH₂ — сфере [55].

Образцы по 100 мг активного панкреатического экстракта наносились на колонку (60×15 мм): для элюирования использовались водные растворы формиата аммония (0.05 М муравьиная кислота + 25%-ный аммиак до pH 8,0). Объем фракции 6 мл; фракции отбирались с интервалами 20 мин. Оптическая плотность: 1 — примесей и трипсина; 2 — химотрипсина; 3 — комплекса химотрипсина с ингибитором трипсина из легких. Стрелка указывает: а — начало изменения pH от 8,0 до 3,5 (0.1 М раствор муравьиной кислоты, pH которой был доведен до 3,5 при помощи аммиака); для наглядности это же изображено пунктиром; б — введение 20 мг ингибитора трипсина в 5 мл водного раствора формиата аммония.

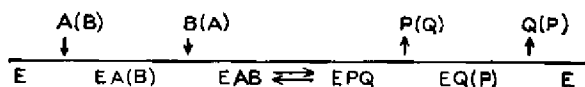
обязаны избирательно сорбировать такие группы ферментов, которые катализируют дву- и многосубстратные реакции.

Двусубстратные ферментативные реакции могут иметь два механизма [35]:

1) двусубстратные с вынужденным (упорядоченным) механизмом



2) двусубстратные с неупорядоченным механизмом



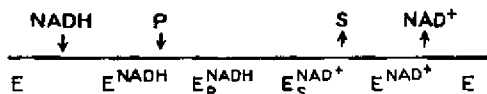
где E — фермент, а A, B, P и Q — реагенты или продукты.

В упорядоченном механизме лиганд A вынужден связываться раньше, чем лиганд B сможет реагировать с образовавшимся двойным комплексом.

В неупорядоченном механизме лиганды A и B могут связываться независимо друг от друга в любом порядке. В этом случае выбор лиганда определяется сродством фермента и относительной легкостью иммобилизации.

Для упорядоченного механизма иммобилизация лиганда A подвержена обычным ограничениям аффинной хроматографии. В этом случае иммобилизация лиганда B не приводит к конкурентному сорбенту для комплементарной молекулы; исключение составляют случаи, когда лиганд A присутствует в рабочем буферном растворе, в котором наносят фермент на колонку. Таким образом, присутствие лиганда A является необходимым для связывания сорбентом ферментов, поскольку лиганд B связывает двойной комплекс лиганд A — фермент. Это позволяет ввести в хроматографию предварительный отбор — избирательное связывание, последующее элюирование достигается удалением лиганда A из рабочего буферного раствора.

Для большинства пиридиннуклеотидзависимых дегидрогеназ имеет место упорядоченный кинетический механизм согласно схеме:



где E — дегидрогеназа, NAD^+ и NADH — окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида. P — продукт, а S — субстрат. На рис. 6.3 приведены результаты аффинной хроматографии глюкозофосфатдегидрогеназы из эритроцитов человека [68]. Фермент, связанный с NADPH, эффективно сорбировался на агарозе, к которой был привязан NADP через дигидразид адипиновой кислоты. Фермент специфически элюировался с колонки при помощи NADP в элюирующем буферном растворе.

Упомянутый кофермент является одним из наиболее распространенных в аффинной хроматографии. Другими часто используемыми аффинными лигандами являются нуклеотиды аденина, ури-

дина, гуанина и флавина, коферменты пиридоксаля, фолата и их аналоги, биотин, липоевая кислота, кобаламины и производные порфирина. Примеры их использования приведены в табл. 11.1; для детального ознакомления можно рекомендовать книгу Лоу и Дина [35].

В качестве примера на рис. 6.4 приведены данные по аффинной хроматографии алкогольдегидрогеназы и фосфофруктокиназы из

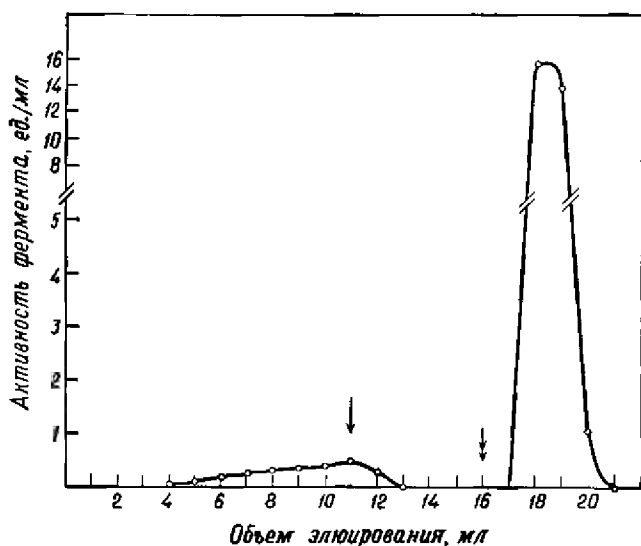


Рис. 6.3. Хроматография глюкозо-6 фосфатдегидрогеназы, связавшей NADPH, на колонке с NADP-агарозой [68].

10 мл частично очищенного образца фермента с NADPH (41 ед.) наносился на колонку (50×5 мм, объем колонки 1 мл) с NADP-агарозой, уравновешенную 0,01 М трис-НСl-буфером (pH 8,0), содержащим 10 ммоль/л $MgCl_2$. После нанесения раствора фермента (одиночная стрелка) колонка промывалась непрерывно буфером. Затем (двойная стрелка) колонка элюировалась буфером, содержащим 1 ммоль/л NADP. Скорость потока 4 мл/мин; 25 °C

частично очищенного экстракта *Bacillus stearothermophilus* на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе [7]. Ферменты элюируются ударным введением 5 мМ NADH (для алкогольдегидрогеназы) или 5 мМ АТФ— Mg^{2+} (для фруктокиназы) (рис. 6.4, а), а также градиентом концентрации KCl (рис. 6.4, б) и градиентом pH (рис. 6.4, в).

Примером аллостерического эффектора для получения специфического сорбента является *n*-аминофениловый эфир dATP, связанный с сефарозой; он использован для выделения T4 рибонуклеотидредуктазы [5]. Для выделения ADP—глюкозопирофосфорилазы из *Escherichia coli* Хауген и др. [25] использовали аффинную хроматографию на сефарозе с присоединенным P^1 -(6-

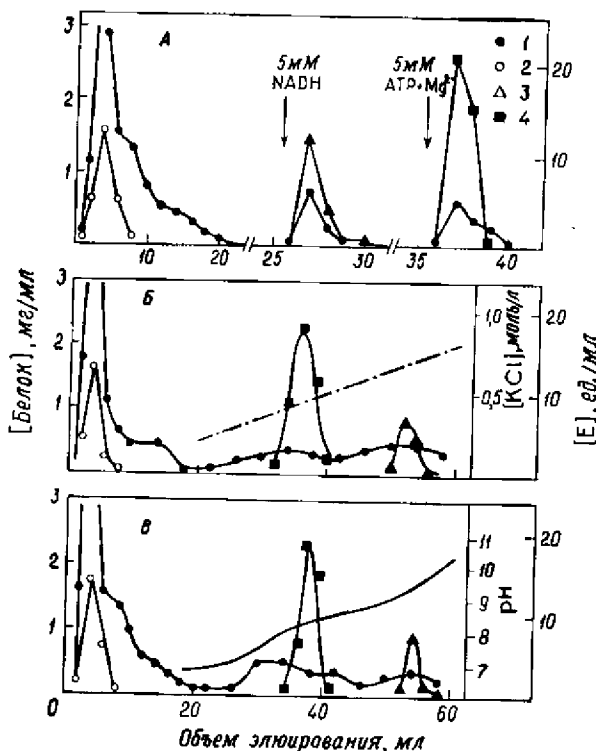


Рис. 6.4. Специфическое элюирование алкогольдегидрогеназы и фосфофруктокиназы с N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP—сефарозы [7].

А. Проводился исчерпывающий диализ 0,5 мл экстракта фермента, содержащего 40,5 Е фосфофруктокиназы и 10 Е или 9,9 мг/мл алкогольдегидрогеназы, против 10 мМ фосфата (рН 6,8), содержащего 0,2 моль/л KCl (этот буфер был также использован для уравнивания), и адсорбция на колонке с AMP—сефарозой. Затем матрица последовательно промывалась: а) уравнивающим буфером (24 мл); б) 5 мМ NADH в том же буфере (5 мл); в) буфером (5 мл); г) 5 мМ АТР+5 мМ Mg^{2+} в буфере (5 мл). Скорость потока 0,4 мл/мин. Б. Элюирование в градиенте концентрации KCl в условиях, описанных выше (А). После адсорбции колонка промывалась 20 мл 10 мМ фосфатом (рН 6,8), содержащим 0,2 моль/л KCl. Линейный градиент концентрации (0,2—0,8 моль/л) KCl создавали в том же буфере; объем элюата 40 мл.

В. Элюирование в градиенте рН в условиях, описанных выше (А); однако образец уравнивался 10 мМ N-2-оксэтилпиразин-N'-2-тансульфатом (рН 6,8). После адсорбции колонка промывалась тем же буфером (20 мл). Затем задавали градиент рН (объем элюата 40 мл): 10 мМ оксэтилпиразинтансульфат+5 мМ глицилглицин, рН 10,4.

1 — белок; 2 — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 3 — алкогольдегидрогеназа; 4 — фосфофруктокиназа.

фосфо-1-гексил)- P^2 -(6-амино-1-гексил)пирофосфатом, который имеет сходство с аллостерическим активатором. Примером выделения фермента с использованием укрепленного на носителе антитела является аффинная хроматография щелочной фосфатазы на сефарозе с ковалентно связанными антителами к этому белку [47].

Выделение ферментов на сорбенте со свободными SH-группами рассмотрено в разд. 6.6.

Для выделения ингибиторов и кофакторов наиболее часто в качестве аффинных лигандов используются связанные ферменты. На рис. 6.5 сопоставлены данные по выделению ингибитора химотрипсина из неочищенного экстракта картофеля на сфероне с ук-

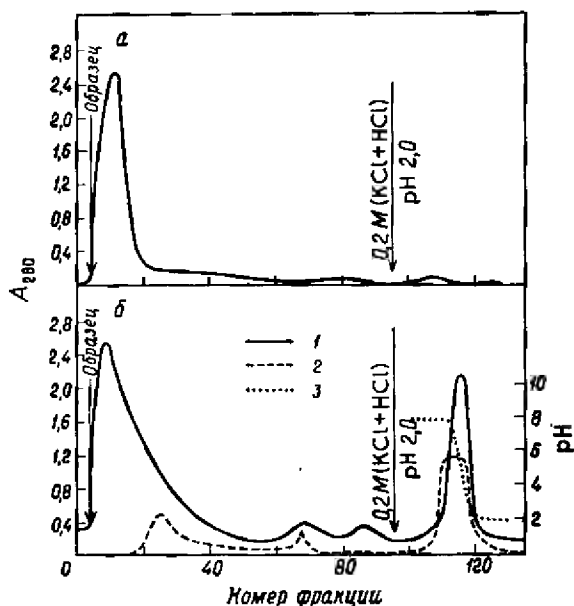


Рис. 6.5. Хроматография неочищенного экстракта картофеля на: а — сфероне 300; б — химотрипсин — сфероне 300 [56].

3 г неочищенного экстракта картофеля наносились на колонку (20×18 мм); собирались фракции по 10 мл с интервалом в 1 ч. 1 — оптическая плотность элюатов при 280 нм; 2 — активность ингибитора; 3 — изменение pH. Стрелки указывают замену элюирующего 0.2 М трис-HCl-буфера с pH 8.0 на другой [0.2 М (KCl+HCl)] с pH 2.0.

репленным химотрипсином (рис. 6.5, б) с аналогичной хроматографией на немодифицированном сфероне (рис. 6.5, а). Хроматография на немодифицированном сфероне проводилась для того, чтобы контролировать, что в данных экспериментальных условиях не наблюдается элюирования материала, неспецифически сорбированного на нерастворимом носителе [56].

Если ингибитор содержит концевые гликозильные группы, для его выделения может быть использован конканавалин А. Примером является выделение α₁-антитрипсина из сыворотки крови человека на сефарозе с присоединенным конканавалином А [40]. Майеровиц и др. [41, 42] получили значительно обогащен-

ный α_1 -антитрипсином продукт из человеческой и мышьиной сыворотки крови путем удаления загрязняющего продукт альбумина иммуносорбцией на сефарозе с укрепленными антителами к альбумину.

6.3. ИММУНОАФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Взаимодействие антител с их антигенами сравнимо по специфичности со связыванием субстратов с ферментами. Константы диссоциации комплексов, как правило, находятся в интервале 10^{-5} — 10^{-8} моль/л [39]. Для выделения антител используются антигены или гаптены (химически модифицированные группы, выступающие в роли иммуноагентов после их присоединения к белкам или синтетическим полипептидам), против которых эти антитела получены. В табл. 11.1 даны многочисленные примеры.

Антитела, индуцируемые определенными антигенами, характеризуются значительной гетерогенностью. При использовании простых химически определенных гаптенных причины для такой гетерогенности могут быть следующими [35]:

1. Гаптены могут быть присоединены к различным частям молекулы-носителя и поэтому иметь различное микроокружение. Такая возможность исключается, если используются белки-носители, содержащие единственную аминокислоту, способную вступать в реакцию связывания, или используется синтетический полипептид, содержащий аминокислоту одного типа.

2. Гаптен может быть ориентирован различными способами относительно поверхности молекулы антигена.

3. Антитела могут быть нацелены против различных частей молекулы гаптена. С антителами против белков ситуация еще более сложная, потому что белок содержит различные антигенные группы, которые еще менее определены, чем в случае простых гаптенных. Более того, сыворотка содержит несколько классов белков с активностью антител, такие, как иммуноглобулины IgG, IgM и IgA.

Гетерогенность участков связывания в антителах приводит к набору констант диссоциации для комбинаций антиген - антитело. При иммобилизации антигена на нерастворимом носителе образуется специфический иммуносорбент, который должен обладать следующими свойствами:

- 1) способностью адсорбировать комплементарное антитело из смеси компонентов;

- 2) освобождать адсорбированное антитело из комплекса со специфическим сорбентом количественно в условиях, безвредных для специфической активности антитела;

- 3) высокой адсорбционной емкостью по специфическому антителу;

4) сохранять свою биологическую активность после повторного использования и хранения;

5) обладать подходящими механическими свойствами, позволяющими центрифугировать, фильтровать и наполнять колонки.

Удовлетворение этим требованиям зависит не только от качества и количества связанного антитела, но также от природы нерастворимого носителя и природы связи.

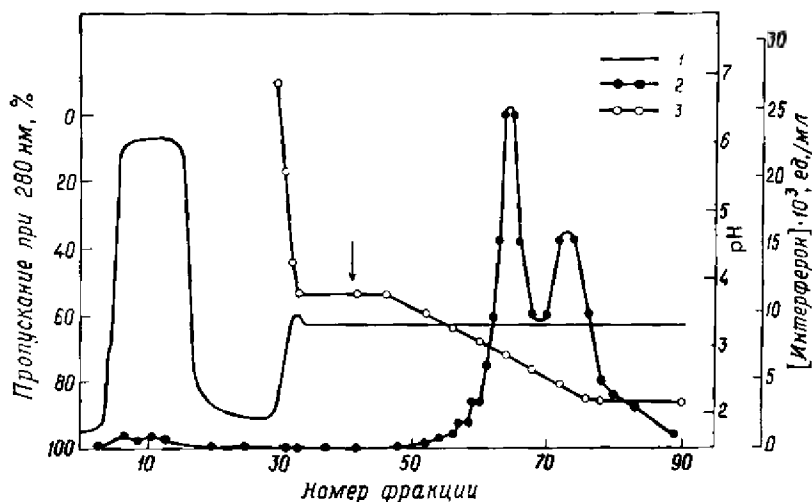


Рис. 6.6. Очистка интерферона лейкоцитов человека ($2.3 \cdot 10^6$ ед.) на колонке (110×20 мм) с антителами к интерферону лейкоцитов [2].

После загрузки образца колонка промывалась соевым раствором в фосфатном буфере, а затем фосфатцитратным буфером Макилвайна (рН 3.8), содержащим 500 мкг/мл цитохрома с. Интерферон элюировался в градиенте рН, начало наложения градиента указано стрелкой. Около 80% активности интерферона собрано в двух пиках. 1 — пропускание; 2 — содержание интерферона; 3 — изменение рН.

Если в ходе выделения антител к глюкагону на сефарозе с укрепленным глюкагоном [39] на колонку наносили сыворотку с низким титром (200—300), активные антитела элюировали 0,15 М хлоридом натрия, доведенным до рН 11 водным аммиаком, либо одноступенчато, либо в градиенте. Полное отделение от неспецифически сорбированных белков достигалось только в последнем случае. Если титр антисыворотки ~ 700 , освобождение антител из колонки происходило только после пропускания через нее 0,15 М хлорида натрия с рН 11 в объеме, равном 30 объемам колонки. Если титр наносимой антисыворотки ~ 1000 , антитела нельзя элюировать даже 100-кратным (относительно объема колонки) объемом 0,15 М хлорида натрия (рН 11), и антитела сходят с колонки с фронтом растворителя только при пропускании 0,1 М уксусной кислоты, рН которой доведен до 2,2 муравьиной кислотой. Однако если титр наносимой антисыворотки был в ин-

тервале 1400—9000, то даже 100-кратный объем 0,1 М уксусной кислоты (рН 2,2) не может снять антитела с колонки. Антитела элюируются только 4 М гуанидинхлоридом. Эти результаты получены с антителами одного и того же животного в различные периоды программы иммунизации. Подобное поведение наблюдалось также с антителами от разных кроликов.

При использовании для приготовления специфического сорбента глюкагона, модифицированного окислением перекисью водорода, алкилированием 2-окси-5-нитробензилбромидом или нитрованием тетранитрометаном, для элюирования антител из комплекса с иммобилизованным аффинным лигандом достаточно значительного более мягкие условия. В то время как для эффективного элюирования (пики появляются в объеме элюата, равного 2 объемам колонки) с колонок с немодифицированным глюкагоном необходим 4 М гуанидинхлорид, для аналогичного элюирования с колонок с глюкагоном, модифицированным окислением перекисью водорода, алкилированием 2-окси-5-нитробензилбромидом или нитрованием тетранитрометаном, эффективен 0,15 М NaCl при рН 11.

Напротив, для выделения антигенов могут быть использованы иммобилизованные антитела. Антигены могут принадлежать к весьма разнообразным типам веществ, и поэтому в табл. 11.1 представлены антитела как аффинные лиганды для выделения очень многих различных соединений.

На рис. 6.6 в качестве примера показано выделение интерферонов лейкоцитов человека на сефарозе с прикрепленными соответствующими антителами [2]. Интерфероны являются гликопротеинами с молекулярной массой ~25 000, которые обладают родо- или семейноспецифичной антивирусной активностью против широкого спектра вирусов. Иммобилизованные антитела рассматриваются ниже в разд. 6.7 с точки зрения их применения для выделения специфических пептидов. В этом плане интересно также использование иммобилизованных антидинитрофенильных антител для выделения трипсина в комплексе с динитрофенилированным ингибитором трипсина из соевых бобов [63]. Иммобилизованные антитела играют важную роль и при выделении клеток; эта проблема детально обсуждается в разд. 6.10. Иммуносорбенты применяются не только для выделения, они могут быть полезны для обнаружения структурных различий, например между ядерными и митохондриальными дегидрогеназами [13].

6.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕКТИНОВ, ГЛИКОПРОТЕИНОВ И САХАРИДОВ

Лектины — это белки или гликопротеины растительного (фитогемагглютнины) или животного происхождения, проявляющие более или менее избирательное сродство к углеводам или груп-

пам углеводов. Эти белки, похожие на антитела, реагируют с компонентами клеточной мембраны и агглютинируют эритроциты, опухолевые и эмбриональные клетки [35]. Агглютинины с определенной специфичностью к сахарам могут, следовательно, быть полезными при изучении поверхностных структур клеток, транс-

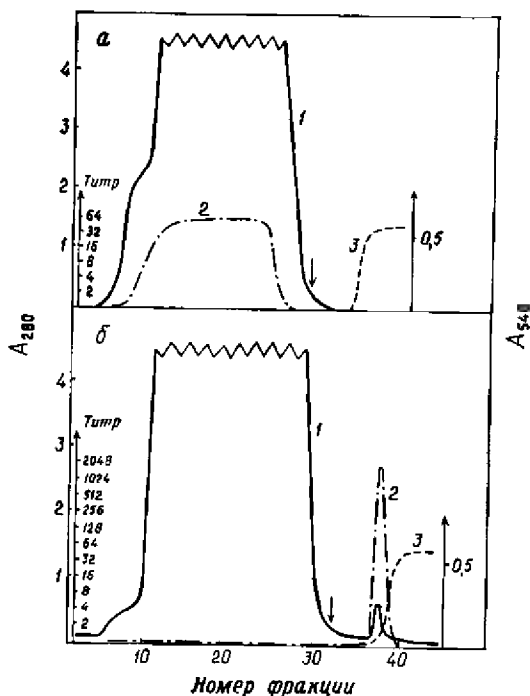


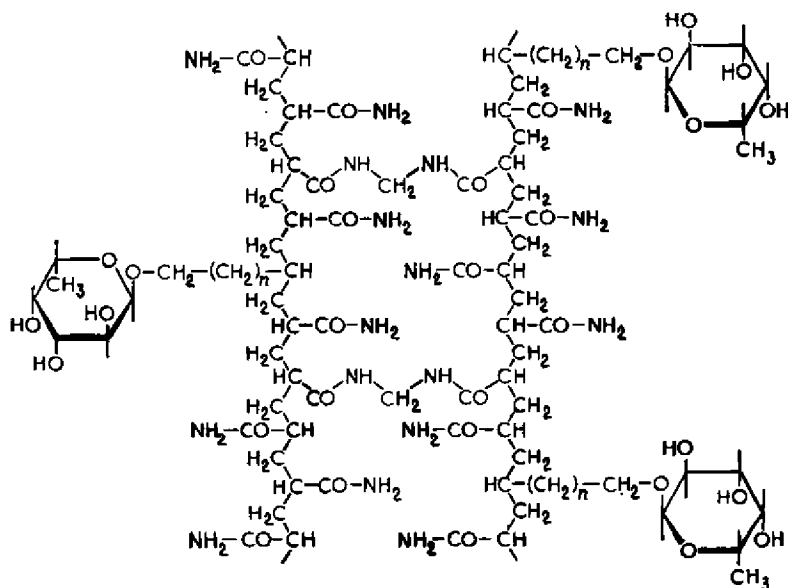
Рис. 6.7. Хроматография осветленного, диализованного неочищенного экстракта семян кроталирии на: а — ECD-сефарозе 6В (сефароза 6В обрабатывалась эпихлоргидрином в щелочной среде с последующим щелочным гидролизом); б — ECD-сефарозе 6В, обработанной кислотой в течение 3 ч (0,2 М HCl, 50 °С) [18]. Колонки 100×19 мм; скорость потока 15 мл/г; объем фракции 2,5 мл. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — титр гемагглютинации; 3 — оптическая плотность при 540 нм (концентрация сахара, определяемая орциновым методом). Стрелки указывают начало элюирования буфером, содержащим лактозу.

формированных малигнизирющими опухолями и вирусами. Данные по выделению аффинной хроматографией ряда лектинов приведены в табл. 11.1.

Для выделения ряда лектинов использованы продажные препараты полисахаридов, такие, как сефадекс и сефароза. На рис. 6.7 представлены результаты биоспецифической аффинной хроматографии фитоагглютининов из неочищенного экстракта семян кроталирии (*Crotalaria juncea*) на ECD-сефарозе после

3 ч обработки 0,2 М соляной кислотой при 50 °С. Галактановые цепи гидролизвались без полного разрушения матрицы геля. Тем самым увеличивалось количество концевых галактозильных групп, необходимых для специфической адсорбции гемагглютининов. Значение гидролиза хорошо видно из сопоставления с результатами хроматографии того же экстракта в аналогичных условиях на ECD — сефарозе необработанной кислотой (рис. 6.7, а).

Выделение агглютинаина из зародышей пшеницы [34] на сефарозе с ковалентно связанным 2-ацетиамидо-N-(ε-аминокапроил)-2-дезокс-β-D-глюкопиранозиламином является примером использования специфического сорбента, приготовленного ковалентным присоединением моносахарида к нерастворимому носителю. Хорейши и Коцоурек [27] приготовили ряд специфических сорбентов для выделения фитогемагглютининов из различных источников путем сополимеризации алкенил-О-гликозидов с акриламидом и N,N'-метиленабисакриламидом. Таким способом полученные гидрофильные гели содержат сахара, связанные О-гликозидными связями с алкильными боковыми цепями матрицы. В качестве примера приведем частичную вероятную структуру О-α-L-фукопиранозильных производных (исходным мономером сополимеризации служил аллил-α-L-фукопиранозил):



Для аффинной хроматографии гликопротеинов в качестве аффинных лигандов используются антитела или лектины. Использование антител как аффинных лигандов рассмотрено в разд. 6.3.

Выделение гликопротеинов с помощью иммобилизованных лек-

Классификация лектинов^a по их основному средству [29]

Группа лектинов	Сахар, по которому проявляется специфичность	Источник лектина, свойства
I	L-Фукоза	<i>Lotus tetragonolobus</i> , слабо ингибируемый L-галактозой <i>Ulex europaeus</i> (утесник обыкновенный) содержит другие лектины, принадлежащие к группе VII <i>Ulex parviflorus</i> , слабо ингибируемый другими сахарами
II	N-Ацетил-D-глюкозамин	Группа, ингибируемая N-ацетилируемыми хитодекстринами <i>Triticum vulgare</i> (зародыши пшеницы), ингибируемый также N-ацетилнейраминной кислотой <i>Solanum tuberosum</i> (клубни картофеля), ингибируемый также муравьиной кислотой
III	N-Ацетил-D-галактозамин	<i>Dolichos biflorus</i> <i>Phaseolus lunatus</i> (бобы лимы, называемые также <i>P. limensis</i>) <i>Phaseolus vulgaris</i> (фасоль, красная, черная, желто-восковая; источником является мука из фасоли) <i>Vicia cracca</i> ; содержит также неспецифические лектины группы VIII <i>Euonymus europaeus</i> <i>Helix pomatia</i> (улитка)
IV	D-Галактоза	Группа ингибируется также L-арабинозой, D-фукозой, лактозой, раффинозой и меллибзиозой <i>Crotalaria juncea</i> (крателярия), β-специфический <i>Ricinus communis</i> (бобы касторки) <i>Abrus precatorius</i> <i>Griffonia simplicifolia</i>
V	N-Ацетил-D-галактозамин и D-галактоза	Эти лектины ингибируются почти одинаково обоими сахарами <i>Sophora japonica</i> (софора японская) <i>Glycine max</i> (соевые бобы), α-специфический <i>Curagana arborescens</i> <i>Banisteria simplicifolia</i> , α-специфический <i>Bauhinia variegata</i> вариант <i>candida</i> <i>Momordica charantia</i> <i>Erythrina subroosa</i> <i>Coronilla varia</i> , α-специфический <i>Crotalaria zanzibarica</i> <i>Arachis hypogea</i> , β-специфический <i>Sesamum indicum</i>
VI	D-Глюкоза	<i>Pisum sativum</i> (горох); ингибируется примерно в четыре раза лучше D-маннозой

Продолжение табл. 6.1

Группа лектинов	Сахар, по которому проявляется специфичность	Источник лектина, свойства
VII	β -Гликозиды и β -N-ацетилглюкозаминиды	Группа ингибируется наиболее сильно N,N'-диацетилхитобиозой, а также салицил[2-(оксиметил)фенил- β -D-глюкопиранозидом], фенил- β -D-глюкопиранозидом и целлобиозой <i>Ulex europaeus</i> (утесник обыкновенный); содержит другой лектин, принадлежащий группе I <i>Ulex galli</i> <i>Ulex nanus</i> <i>Cytisus sessilifolius</i> ; ингибируется также лактозой <i>Laburnum alpinum</i> ; ингибируется также лактозой <i>Clerodendrum viscosum</i> ; источником является мякоть
VIII	Метил- α -D-маннозид, D-манноза, D-глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамин, L-сорбоза	Сахара перечислены в порядке убывания ингибирования <i>Pisum sativum</i> (горох); ингибируется также D-глюкозой, однако эффективность последней в четыре раза ниже <i>Lens culinaris</i> (чечевица) <i>Canavalia ensiformis</i> (канавалия, дает конканавалин A); источником служит мука бобов <i>Vicia crassa</i> ; содержит также лектины группы III <i>Lathyrus sativus</i> L.
IX	N-Ацетилнейраминная кислота	<i>Limulus polyphemus</i> (лимфа крови подковообразного краба) <i>Triticum vulgare</i> (зародыши пшеницы); содержит также лектины группы II

^a Если не указано особо, источником лектинов служат семена растений.

тинов основано на использовании их различной аффинности по концевым углеводным остаткам, характеристичным для отдельных гликопротеинов. При разработке подходящего метода очистки данных гликопротеинов или гликопептидов с помощью лектинов Кристиансен [20] рекомендует следующие этапы:

- 1) идентификация концевого сахара или сахаров в углеводной части исследуемого вещества;
- 2) выбор лектина с соответствующей специфичностью;
- 3) приготовление выбранного лектина;
- 4) иммобилизация лектина путем образования ковалентной связи с нерастворимым носителем;
- 5) нахождение оптимальных условий сорбции выделяемого вещества на иммобилизованном лектине;
- 6) нахождение условий десорбции.

При хроматографии на иммобилизованных лектинах можно выбрать либо неспецифическое элюирование (изменение pH или концентрации соли), либо любой специфический метод (например, вытеснение адсорбированного гликопротеина конкурирующими углеводами).

Если известны концевой сахар или сахара гликопротеинов, можно выбрать подходящий лектин. Как правило, специфичность лектинов не ограничивается одним сахаром, хотя в степени их

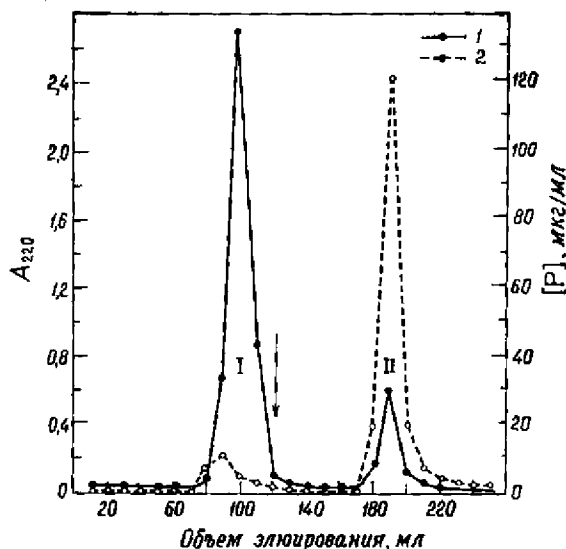


Рис. 6.8. Аффинная хроматография автолизата клеточных стенок *Bacillus subtilis* 168 на конканавалин А — сефарозе 4В [14].

Автолизат (45 мг) растворялся в 5,0 мл 0,03 М трис-HCl-буфера (pH 7,3) и наносился на аффинную колонку (200×25 мм). Для элюирования использовался 0,03 М трис-HCl-буфер (pH 7,3); скорость потока 160 мл/ч; объем фракции 10 мл. Гликан, пептид и фрагменты пептидогликана выходили в пике I. Тейхоевая кислота удерживалась на колонке. В момент, указанный стрелкой, добавляли раствор 0,05 М α -метил-D-глюкозы в 0,03 М трис-HCl (pH 7,3), и тейхоевая кислота выходила в виде пика II. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — содержание белка.

специфичности существуют большие различия. Например, лектин из семян *Lotus tetragonolobus* характеризуется узкой специфичностью по L-фукозе, в то время как конканавалин А из *Canavalia ensiformis* обладает широкой специфичностью и связывает большинство гликопротеинов из сыворотки крови человека. В табл. 6.1 дана классификация лектинов по их основной аффинности.

Примеры использования лектинов для выделения гликопротеинов и гликопептидов даны в табл. 11.1. Два иммобилизованных лектина, а именно лектин из *Crotalaria juncea*, специфичный для конфигурации галактозы (он реагирует с углеводами и гликопро-

теинами, содержащими галактозу), и широко специфичный конканавалин А, нашли применение при фракционировании сывороточных белков [19].

Известно, что конканавалин А взаимодействует с незащищенными α -D-глюкопиранозильным, α -D-маннопиранозильным или β -D-фруктофуранозильным остатками полисахаридов. Многие биологические мембраны содержат гликопротеины, структура и функции которых большей частью неизвестны. Чтобы понять роль этих гликопротеинов в структуре мембран микросом, Уинквист и др. [66] выделили гликопротеины из мембран микросом печени на сефарозе с присоединенным конканавалином А. На рис. 6.8 показано использование этого специфического сорбента (конканавалин А — сефароза) для выделения тейхоевой кислоты из автолизата клеточных мембран *Bacillus subtilis* [14]. Упомянутая колонка имела более высокую емкость по полисахаридам, чем по тейхоевой кислоте. При тех же условиях, при которых сорбировалось ~60—70 мг тейхоевой кислоты, задерживалось на колонке 450 мг гликогена из печени кролика. Использование иммобилизованного конканавалина А для выделения клеток рассмотрено в разд. 6.10.

6.5. ВЫДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ. СВЯЗЫВАНИЕ И ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

Главное действие некоторых гормонов направлено на плазматическую мембрану клеток-мишеней. Под термином «рецептор» обычно понимают компоненты плазматических мембран, которые вовлечены во взаимодействие с данным гормоном. Они, по-видимому, локализованы исключительно на поверхности мембранных клеток. Для того чтобы выяснить действие гормонов на молекулярном уровне, необходимо очистить и идентифицировать эти специфические мембранные рецепторные структуры, количество которых в тканях очень мало по сравнению с другим присутствующим материалом. Например, концентрация рецептора глюкагона в мембранах клеток печени очень низка и составляет $2,6 \text{ пмоль в } 1 \text{ мг белка}$ [30]. При столь малых количествах взаимодействие с иммобилизованными гормонами должно быть очень эффективным, чтобы обеспечить прочное связывание крупных мембранных фрагментов. Взаимодействие гормонов с их комплексными рецепторами специфично и характеризуется высоким сродством. Константа диссоциации для глюкагона равна 10^{-9} — 10^{-10} моль/л, для инсулина — $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л, а для норэпинефрина — 10^{-6} — 10^{-7} моль/л [35]. Очень трудно выделять такие малые количества стандартными методами. Использование биоспецифической хроматографии на высокоэффективных иммобилизованных рецепторах позволяет избирательно концентрировать

такие небольшие количества и выделять с относительно высоким выходом.

Хотя технические трудности, связанные с разработкой подходящих методов определения рецепторной активности, и трудности солиubilизации долгое время мешали развитию методов очистки

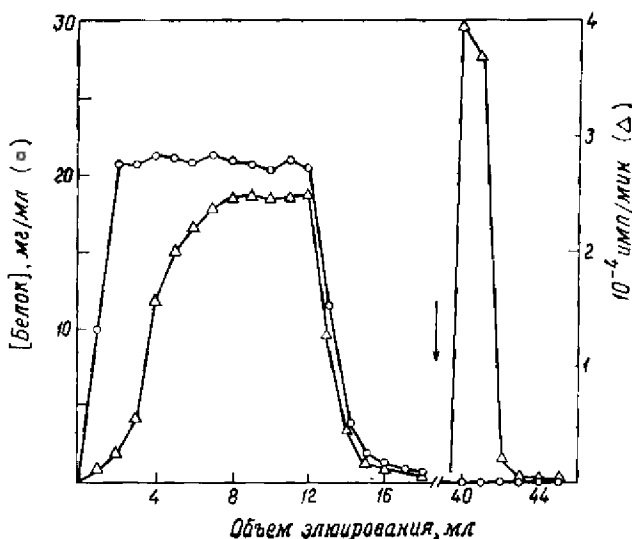


Рис. 6.9. Аффинная хроматография солиubilизированных детергентом рецепторов инсулина мембран клеток печени на аффинных колонках, содержащих диаминодипропиламиносукцинил-N-фенилаланил—инсулин—агарозу [8].

Гомогенизированные мембраны клеток печени экстрагировались 2%-ным (по объему) тритоном X-100 путем встряхивания при 24°C в течение 10 мин; затем смеси центрифугировались. Проводился диализ супернатанта в течение 16 ч при 4°C против гидрокарбонатного буфера Кребса—Рингера (pH 7.4), содержащего 0.1 об. % тритона X-100. Затем 12 мл супернатанта при 24°C очень медленно пропускались через аффинную колонку (пастеровскую шпигетку $V_t = 1.3$ мл), которая предварительно промывалась в течение 20 ч 0.1 М NaHCO_3 буфером (pH 8.4) и уравнивалась (2 ч) гидрокарбонатным буфером Кребса—Рингера, содержащим 0.1 об. % тритона X-100. Колонка «исчерпывающе» промывалась (разрыв на абсциссе) перед элюированием (стрелка) 0.05 М Na ацетатным буфером (pH 6.0), содержащим 1.5 моль/л мочевины и 0.1 об. % тритона X-100. После наивнесения этого буфера на колонку поток останавливался на 15 мин, а затем хроматография возобновлялась. При определении белка собирали фракции по 1 мл; для установления специфического связывания [125 I]инсулин использовалась методика с полиэтиленгликолем.

рецепторов с помощью аффинной хроматографии, ряд мембранных фрагментов со специализированной рецепторной активностью был выделен. В табл. 11.1 приведены выделенные рецепторы и аффинные лиганды. В разд. 5. 3. уже рассматривалось выделение α -бунгаротоксинсвязывающих мембранных компонентов из электрического органа *Torpedo californica* (рис. 5.9). Аффинная хроматография рецептора инсулина, солиubilизированного с детергентом, с использованием диаминодипропиламинсукцинил-N-фенилаланил—инсулина—агарозы показана на рис. 6.9. [8].

Ограниченные запасы витаминов и гормонов в животных привели к развитию механизмов адсорбции, транспорта и консервации этих веществ в следовых количествах. В таких процессах важную роль играют специфические транспортные или связывающие белки, предотвращающие быстрое выведение витаминов и гормонов с мочой, которое происходило бы, если витамины и гормоны не были бы связаны в плазме в соответствующих комплексах. Связывающие белки присутствуют в очень низких концентрациях. Например, белки, прочно связывающие витамин B_{12} , транскобаламины I и II, находятся в плазме крови человека в концентрациях соответственно 80 и 20 мг на 1000 л. Однако они обычно имеют высокое сродство к комплементарным витаминам и гормонам. Константы диссоциации этих комплексов находятся в интервале от 10^{-7} до 10^{-16} моль/л [35]. Из-за низких концентраций эти белки нельзя выделить классическими методами очистки; наличие специфических взаимодействий с высоким сродством позволяет использовать аффинную хроматографию, которая допускает работу с большими объемами исходного материала. Как и для взаимодействий антитело — антиген, трудности заключаются в последующем выделении белка из комплекса с аффинными сорбентами.

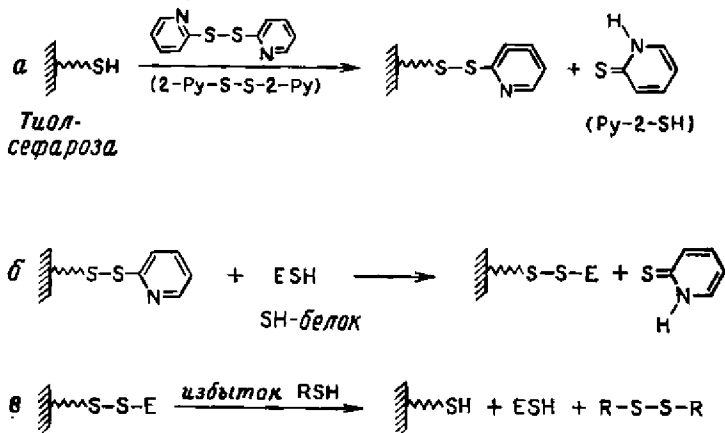
Например, для того чтобы снять авидин с биотинин — сефарозы, использовали 6 М гуанидинхлорид в солянокислом растворе (pH 1,5) [10]. В табл. 11.1 приведены и другие примеры выделения связывающих и транспортных белков с использованием аффинных лигандов.

6.6. ВЫДЕЛЕНИЕ SH-БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Для выделения белков и пептидов, содержащих свободные SH-группы, целесообразно использовать высокое сродство меркаптосоединений к ионам тяжелых металлов, главным образом ртути. В табл. 11.1 дан ряд примеров выделения как белков, так и пептидов, основанного на образовании упомянутого комплекса. На рис. 6.10 приведены результаты выделения SH-протеазы из неочищенного экстракта бобов, осуществленного в колонке на оксикалметакрилатном геле, содержащем ртутное производное метакриланилида [57]. SH-протеазу с оптимумом протеолитической активности при pH 8 можно выделить из смеси протеолитических ферментов этим способом за одно хроматографическое разделение. После удаления неактивного материала гель-фильтрацией через сефадекс G-75 сразу получается гомогенная протеаза [58].

Для выделения папаина, бромелаина, химопапаина, фицина, пропапаина, креатинфосфокиназы и фосфофруктокиназы Брокле-хорст и др. [6] использовали полимер с 2,2'-дипиридилдисульфи-

дом. Выделение белка ESH, содержащего тиольную группу, осуществляется по следующей схеме:



Между выделяемым белком и нерастворимым носителем образуется ковалентная связь, которая после отмывки несорбированного материала расщепляется под действием избытка низкомолекулярного тиола RSH. Поскольку имеет место образование ковалентной связи, этот тип хроматографии называется «ковалентной хроматографией» и рассмотрен в разд. 7.2.

Егоров и др. [17] использовали тиол-дисульфидный обмен на глутатион-2-пиридилдисульфид — агарозе в качестве быстрого и специфического метода для выделения тиолсодержащих пептидов из крупных белков. Парвальбумин (109 аминокислотных остатков и один цистеиновый), меркаптальбумин (565 аминокислотных остатков и один цистеиновый) и церулоплазмин (1065 аминокислотных остатков и три цистеиновых) присоединялись к модифицированному носителю через дисульфидные мостики. Имобилизованные белки расщеплялись протеолитическими ферментами. После промывки пептиды, содержащие тиольную группу, элюировались при помощи восстанавливающего агента, затем проводился препаративный электрофорез на бумаге, который оказался достаточным для получения чистых пептидов с хорошим выходом. Преимущество этого метода состоит в том, что он дает возможность из родственных белков очень просто получать пептиды-гомологи.

Среди ионов тяжелых металлов для образования комплексов с тиольными группами белков и пептидов следует упомянуть Zn^{2+} и Cu^{2+} . Для метода, основанного на использовании хелатных гелей, содержащих эти ионы, Порат и др. [48] ввели термин «металлохелатная аффинная хроматография». Этот метод детально рассмотрен в разд. 7.6.

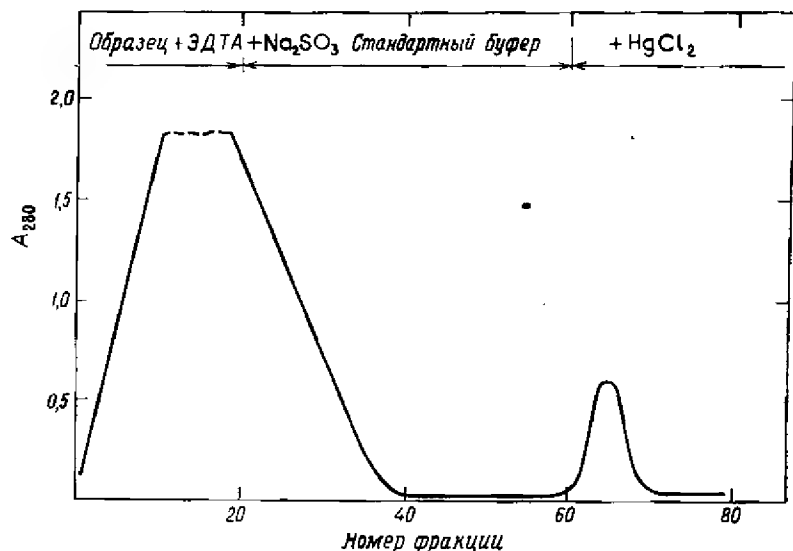


Рис. 6.10. Выделение SHI-протеиназы из неочищенного экстракта бобов на оксипропилметакрилатном геле, содержащем 15% метакрилангида [57].

Колонка 100×10 мм. Объем фракции 5 мл, интервал отбора фракций 15 мин. Состав стандартного буферного раствора: 0,5%-ный бутанол+10%-ный диметилсульфоксид+0,1 М KCl+0,05 М CH_3COONa . Элюирующий буферный раствор готовился из стандартного буферного раствора, в который добавлялось 0,5 ммоль/л HgCl_2 .

6.7. ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Если определяемые аминокислоты расположены в активном центре или на поверхности белковой молекулы, успешно используется химическая модификация белков с последующим выделением меченых пептидов. Однако выделение пептидов, содержащих модифицированный остаток, достигается не легко главным образом потому, что модифицирующий реагент часто реагирует с другими остатками, давая продукты с различными выходами. По этой причине гидролизат белка содержит несколько модифицированных пептидов, каждый из которых присутствует в количествах, меньших эквимольных по отношению к белку. Традиционные методы выделения пептидов включают трудоемкие и длительные операции, каждая стадия которых обычно значительно снижает конечный выход пептида. Использование аффинной хроматографии на сорбенте, специфичном к модифицирующему реагенту, позволяет в одну стадию выделить модифицированный пептид. Вилчек [62] различает три категории модификаций белков:

1) направленная модификация или аффинное введение метки в остатки активного центра белка;

2) избирательная модификация одного или нескольких остатков, обусловленная сверхвысокой реакционной способностью или локализацией на поверхности белка;

3) полная модификация всех боковых цепей определенных аминокислот специфическим для данной группы реагентом с целью определения аминокислотной последовательности.

К первой категории относятся реакции субстратных аналогов с аминокислотами в активном центре фермента или реакция гал-

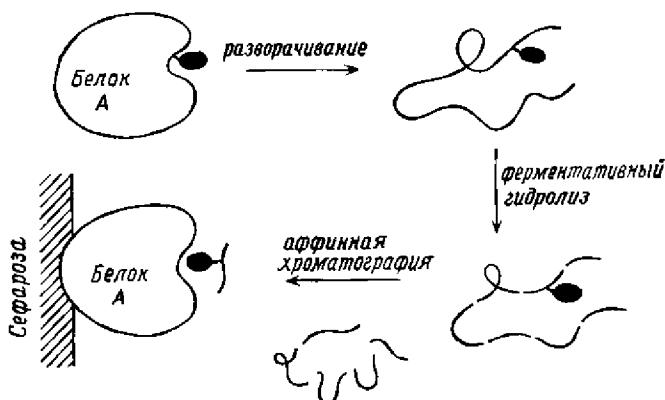


Рис. 6.11. Общая схема выделения меченых пептидов из аффинно-меченого белка [62].

тена в активных центрах антител. В этих случаях за специфическим и обратимым связыванием аналогов в связывающем центре белка следует образование ковалентной связи по (или вблизи) аффинному центру. На рис. 6.11 приведена общая схема выделения меченых пептидов из аффинно-меченого белка. Нативный белок (фермент или антитело), ковалентно связанный с нерастворимым носителем, сорбирует из гидролизата того же аффинно-меченого белка только аффинно-меченый пептид. После промывки колонки специфически сорбированный меченый пептид можно элюировать, если создать такие условия, когда он диссоциирует. Вилчек [61] использовал этот метод для выделения аффинно-меченых пептидов из стафилококковой нуклеазы после реакции с бромацетильным производным дезокситимидин-3'-*n*-аминофенилфосфат-5'-фосфата и с бромацетил-*n*-аминофенилфосфатом. На рис. 6.12 приведены результаты аффинной хроматографии меченых пептидов из триптического гидролизата модифицированной нуклеазы на нуклеаза — сефарозе. В табл. 11.1 даны также другие примеры выделения аффинно-меченых пептидов.

Специфические антитела с высоким сродством могут быть получены почти ко всем небольшим молекулам. Полученные таким

образом специфические антитела, будучи ковалентно связанными с нерастворимым носителем, представляют подходящие специфические сорбенты для пептидов, которые содержат соответствующие небольшие молекулы. Примером такого рода является выделение нитротирозилсодержащих пептидов из триптического гидро-

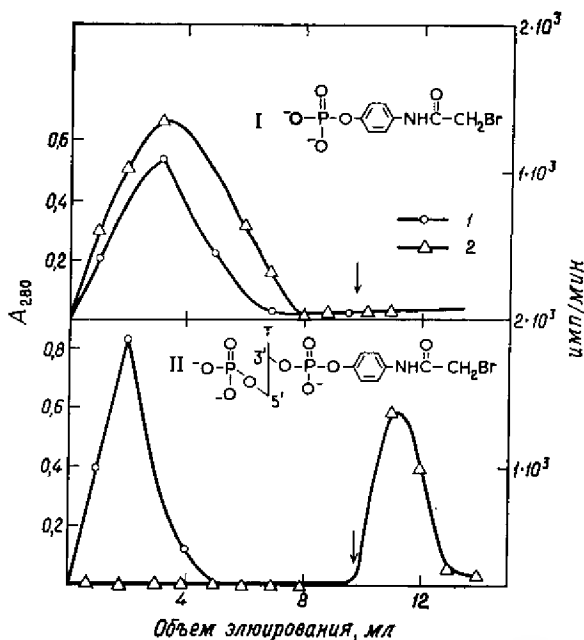


Рис. 6.12. Аффинная хроматография на колонке с нуклеаза сепарозой аффинно-меченных реагентами I и II пептидов [61].

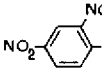
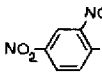
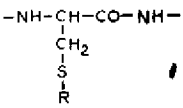
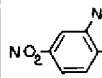
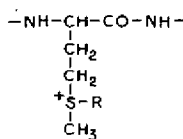
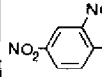
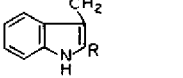
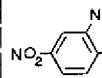
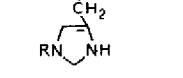
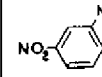
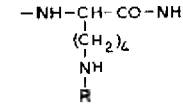
Колонки (20×5 мм) уравнивались 0,05 М боратным буфером (pH 8,0), содержащим 10 ммоль/л CaCl_2 . Триптические гидролизаты модифицированной нуклеазы (1,7 мг) наносились в 0,5 мл того же буфера. После пропускания через колонку 10 мл буфера связавшиеся пептиды элюировались раствором аммиака (pH 11,0); начало элюирования указано стрелкой. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — радиоактивность.

лизата нитротирозил-лизоцима [26] с использованием в качестве аффинного сорбента антител к нитротирозильному остатку, прикрепленных к сепарозе. Если ферментативный гидролизат нитрованного белка пропустить через колонку, содержащую укрепленные антитела к нитротирозину, все пептиды (кроме тех, которые содержат нитротирозин) выйдут в первом пике. Пептиды нитротирозина элюируются затем 1 М аммиаком. Описанную методику можно использовать в исследованиях топографии белка, имеющих целью определение тирозиновых остатков, расположенных на поверхности молекулы.

После появления секвенатора время анализа аминокислотной последовательности белка стало определяться стадией очистки

Таблица 6.2

Использование анти-ДНФ-антител для выделения пептидов

Аминокислота	Реагент RX	Условия	Продукты
Цистеин	 	pH 7,5; 3,4; 25°C pH 5; 1,4; 25°C	
Метионин		24 ч; 25°C; 8 М мочевины pH 3,5	
Триптофан		50%-ная уксусная кислота, 14 25°C	
Гистидин		pH 5; 24 ч; 25°C	
Лизин		pH 5; 24 ч; 25°C	

пептидов. Разработка чувствительных и эффективных методов избирательного выделения модифицированных пептидов создает возможность для получения даже очень небольших количеств пептидов из белков, недоступных в больших количествах (рецеп-

торы, транспортные белки и т. д.). В табл. 6.2 даны примеры использования антидинитрофенильных антител для выделения пептидов, содержащих остатки цистеина, метионина, триптофана, гистидина и лизина [62].

Аффинная хроматография S-пептида и S-белка, образованных в результате протеолитического расщепления бычьей панкреатической рибонуклеазы, обсуждалась в разд. 4.4. Хроматография может даже быть использована для очистки синтетических аналогов S-пептидов (см. табл. 11.1). Выделение пептидов, содержащих свободную SH-группу, рассматривалось в разд. 6.6.

6.8. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И НУКЛЕОТИДОВ

Мононуклеотиды, олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты, ковалентно связанные с инертными матрицами, пригодны как для целей выделения, так и для исследования физико-химических

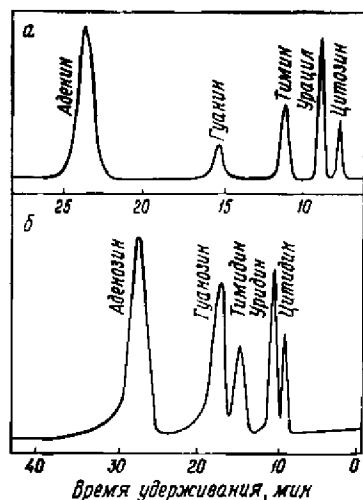


Рис. 6.13. Хроматограммы смеси пяти оснований нуклеиновых кислот (а) и пяти нуклеозидов (б), полученные на смоле, содержащей 8,0 (а) и 16,4% (б) связанного тимина [28].

Пористая сферическая смола синтезирована полимеризацией суспензии глицидилметакрилата в присутствии разбавителя. Присоединение тимина к полученной таким образом смоле проводилось в диметилформамиде при 65 °C в присутствии карбоната калия. Хроматография проводилась в колонке (610×7,6 мм) из нержавеющей стали при 25 °C на жидкостном хроматографе высокого разрешения (HLC-802U, фирмы Toyo Soda Manufacturing Co.); в качестве растворителя использовалась дистиллированная вода. Элюат из колонки фотометрировался при 254 нм. а — скорость потока 3,5 мл/мин при давлении 45 кг/см²; б — размер частиц смолы 15–20 мкм; скорость потока 3,1 мл/мин; температура 30 °C.

свойств нуклеиновых кислот и ферментов, принимающих участие в их синтезе и разрушении.

Иммобилизованные основания нуклеиновых кислот, нуклеозиды или олигонуклеотиды можно использовать при разделении, фракционировании и определении структуры различных нуклеиновых кислот. Примером может служить изучение последовательности нуклеиновых кислот, приведенное Гилагом и Робинсоном [22]. Они, например, разделили гептануклеотиды на колонке с тимидин-полинуклеотид — целлюлозой. Хроматография на ДНК — целлюлозе рассмотрена в обзоре Албертса и Геррика [1]. На

рис. 6.13 показано разделение оснований нуклеиновых кислот и нуклеозидов высокоэффективной аффинной хроматографией с использованием колонки, наполненной пористой сферической смолой диаметром 12—15 мкм, содержащей присоединенный тимин [28].

Многие информационные РНК животных и вирусов богаты полиадениловой кислотой. Часто это может быть использовано

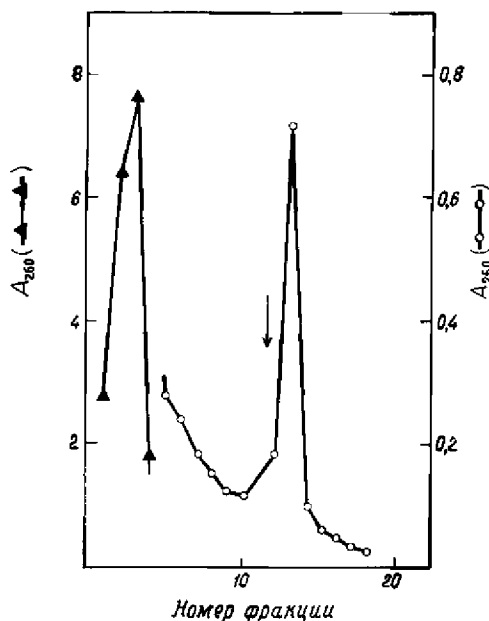


Рис. 6.14. Хроматография РНК ретикулоцитов утки на олигодезокситимидилат—целлюлозе [46].

Колонка (40×5 мм) уравнивалась раствором 0,5 М NaCl+0,5%-ный додецилсульфат натрия+0,01 М трис-буфер (pH 7,5) (начальный буфер). Образцы растворялись в воде, затем разбавлялись равным объемом начального буфера, двукратно более концентрированного, и наносились на колонку. Колонка промывалась ~30 мл начального буфера и затем элюировалась раствором 0,5%-ный додецилсульфат натрия+0,01 М трис-буфер (pH 7,5). После добавления начального буфера к образцам все операции проводились при комнатной температуре, РНК осаждалась при 20 °С из раствора, содержащего 0,1 моль/л NaCl, добавлением двух объемов спирта.

(см. табл. 11.1) для выделения их хроматографией на носителях, содержащих олиготимидиловую кислоту. На рис. 6.14 в качестве примера показана хроматография РНК из ретикулоцитов утки на целлюлозе с присоединенной олиготимидиловой кислотой [46]. Около 94—96% РНК элюируется в первом пике, и элюат содержит рибосомальную и транспортную РНК. Элюат во втором пике содержит кроме рибосомальной РНК информационную РНК 10S глобина. На основании анализа индивидуальных пиков центрифугу-

Таблица 6.3

Емкость колонки по связыванию гомополимеров с различными целлюлозами и их производными

Колонка	Полиадениловая кислота ^а , A_{260} на 100 мг целлюлозы	Полиинизиновая кислота ^б , A_{260} на 100 мг целлюлозы	Полиуридиновая кислота ^в , A_{260} на 100 мг целлюлозы
Олигодезокситимидилат—целлюлоза (CF-11)	3,56	0,90	0,33
Олигодезоксцитидилат—целлюлоза (CF-11)	0,60	1,32	0,36
Обработанная целлюлоза (CF-11)	0,48	1,06	0,21
Необработанная целлюлоза (CF-11)	0,54	1,05	0,22
Необработанная целлюлоза (CC-41)	1,26	1,33	0,37
Необработанная целлюлоза (сигмацелл-38)	1,98	1,83	0,28

^а Нанесено 4,52 A_{260} на каждую колонку.

^б Нанесено 2,40 A_{260} на каждую колонку.

^в Нанесено 4,12 A_{260} на каждую колонку.

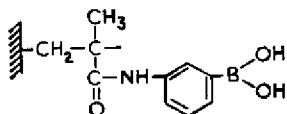
гированием в градиенте сахарозы обнаружен очень хороший эффект разделения. Де Ларко и Гуров [11] испытали ряд целлюлоз, сравнивая способности их производных связывать олигомеры гомонуклеотидов. Из табл. 6.3 следует, что целлюлозы проявляют значительную сорбционную способность, степень которой различна для разных целлюлоз. Поскольку обработка целлюлозы бисульфитом натрия приводит к уменьшению количества сорбируемой полиадениловой кислоты, сделан вывод, что связывание обусловлено лигниноподобными примесями. Специфичность продажной олигодезокситимидилат—целлюлозы ТЗ к молекулам, содержащим полиадениловую кислоту, обсуждается в разд. 6.1f (табл. 6.6).

Линдберг и Персон [33] и Ветекам и сотр. [60] использовали сефарозу с ковалентно связанной полиуридиловой кислотой для выделения РНК из полисом клеток животных. Для очистки ДНК Эдельман [15] также применил аффинный сорбент, приготовленный из сефарозы, однако аффинный не к ДНК, а модифицированный лектинами, подходящими для примесей полисахаридов, которые могут быть с большим трудом удалены из ДНК. Наиболее часто используется конканавалин А—сефароза, поскольку наиболее общими полисахаридными примесями являются фракции гликогена или крахмалоподобные вещества. Если присутствуют полисахариды, которые кроме глюкозы, фруктозы или маннозы

содержат другие концевые группы, то следует использовать также и другие иммобилизованные лектины.

В разд. 4.4 была рассмотрена матричная хроматография [51], применяемая для исследования взаимодействий между пептидами и олигодезокситимидиловой кислотой. Шотт и др. [50] применили также иммобилизованные олигонуклеотиды для избирательного разделения свободных нуклеотидов по механизму образования пар оснований. Комплементарные олигонуклеотиды в подвижной фазе избирательно сорбируются на иммобилизованной матрице, если хроматографию проводить в условиях, необходимых для образования пар оснований. Десорбция осуществляется с помощью градиента температуры. Матричная хроматография позволяет изучать специфичность олигонуклеотидов в образовании нуклеотидных пар и взаимодействие олигонуклеотидов с пептидами.

Для хроматографии мононуклеотидов, олигонуклеотидов и молекул тРНК Шотт и др. [52] использовали сорбенты, содержащие диоксиборильное производное



В этом случае оказывается полезным комплексобразование незамещенных 2',3'-диольных групп, расположенных на 3'-конце полинуклеотидов с РНК и боратым анионом. 3-Аминофенилборная кислота, присоединенная к сукцинилизированной аминододecil-целлюлозе, применена Спризлем и др. [53] для выделения тРНК^{Phe}.

6.9. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, ГОРМОНОВ И ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ

Додecilламин является полезным аффинным лигандом для выделения липидов [12]. При выделении гормонов соответствующие антитела, транспортные белки или лектины служат аффинными сорбентами (см. табл. 11.1). Примером является аффинная хроматография лютеинизирующего гормона овцы на сефарозе с ковалентно связанной иммуноглобулиновой фракцией антител к лютеинизирующему гормону [23].

Холерный токсин, экзотоксин из *Vibrio cholerae*, — белок, ответственный за желудочно-кишечные проявления клинической холеры. В среде культуры *Vibrio cholerae* токсин присутствует в очень низкой концентрации, приблизительно до 1 мг/л. Токсин сильно и специфически связывается некоторыми ганглиозидами мозга. Моносиалоганглиозиды G_{M1}, локализованные в мембране,

являются, по-видимому, естественными рецепторами, специфически взаимодействующими с холерным токсином, в результате чего стимулируется аденилатциклазная система в ткани. Ганглиозиды, связанные с нерастворимыми носителями, служат аффинными сорбентами холерного токсина. Этот токсин связывает также некоторые гликопротеины, такие, как фетуин и тироглобулин.

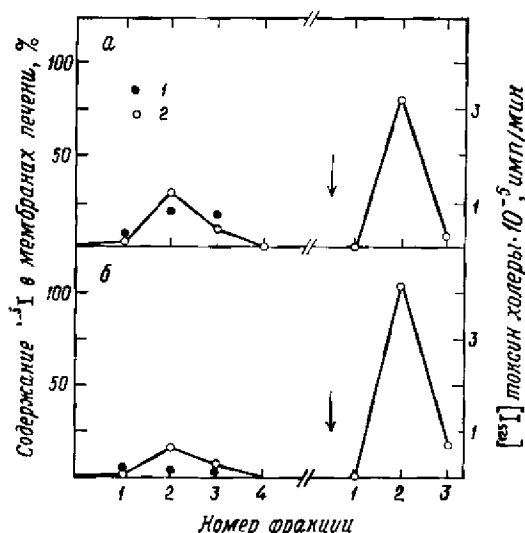


Рис. 6.15. Аффинная хроматография ^{125}I -меченого токсина из *Vibrio cholerae* на фетуин—агарозе (а) и на ганглиозиддиаминодипропиламино—агарозе (б) [45]. 0,5 мл соответствующего геля в пастеровских пипетках промывались 4 ч при 24 °С 50%-ным (по объему) метанолом, а затем 40 мл 7 М гуанидинхлорида и 40 мл гидрокарбонатного буфера Кребса—Рингера, содержащего 0,1% альбумина. Образцы (0,5 мл), наносимые на колонки, содержали $5 \cdot 10^5$ имп/мин ^{125}I -меченого холерного токсина (6,7 мкКи/мкг) в гидрокарбонатном буфере Кребса—Рингера, содержащем 0,1% альбумина. Колонки промывались при 24 °С 20 мл того же буфера (разрыв на оси абсцисс), затем элюировались 7 М гуанидинхлоридом (начало введения элюента указано стрелками). Измерялась радиоактивность каждой фракции (объем фракции 0,5—1 мл). 1 — содержание ^{125}I в мембранах печени; 2 — радиоактивность элюата.

Аффинная хроматография токсина из *Vibrio cholerae*, меченого ^{125}I , на агарозе с присоединенным фетуином или на ганглиозид—диаминопропиламиноагарозе [45] показана на рис. 6.15. Агароза с присоединенными ганглиозидами может быть использована также для очистки других токсических белков, таких, как ботулин или столбнячный токсин, который, как известно, также образует прочные комплексы со свободными ганглиозидами.

Присутствие гениных регуляторных белков в низких концентрациях — типичное явление; кроме того, для этих белков, как правило, неизвестны методы их обнаружения. Регуляторный белок *ara C* (из оперона L-арабинозы) выделен Уилкоксом и Клемент-

соном [65] на сефарозе с присоединенным 4-[4-(4-аминофенил)-бутанамидо]фенил- β -D-фукопиранозидом. Примеры аффинных лигандов для других соединений приведены в табл. 11.1.

6.10. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК И ВИРУСОВ

Разделение клеток, основанное на их аффинности к специфическим носителям, преимущественно к гранулированным, покрытым биоспецифическим реагентом, используется в различных сис-

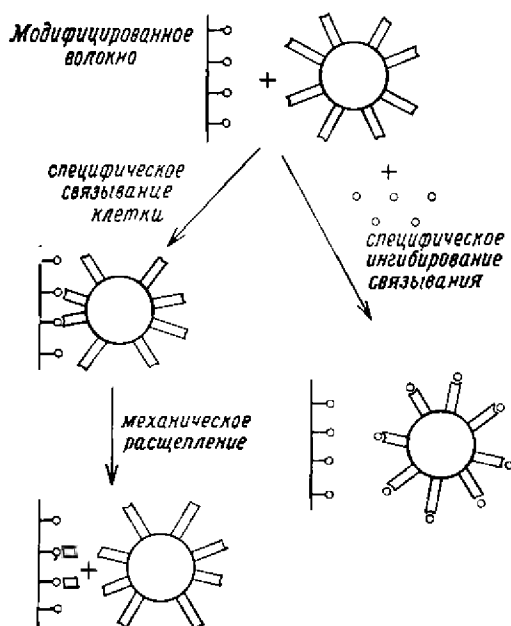


Рис. 6.16. Схема фракционирования на волокнах в общем виде [16].

темах. Вещества, обладающие необходимой специфичностью, такие, как антигены, антитела, лектины и гормоны, либо адсорбируются на этих носителях, либо ковалентно связываются. В табл. 11.1 приведены примеры выделения клеток и используемые для этого аффинные лиганды.

Аффинное фракционирование клеток наиболее часто применяется в анализе популяций лимфоидных клеток. Мэтьюз и др. [36] разработали метод разделения лимфоидных клеток из селезенки и тимуса крысы и селезенки мыши на сефарозе с прикрепленным к ней агрегированным иммуноглобулином крысы.

При фракционировании клеток на волокнах [16] используется способность этих клеток специфически связываться с натянутыми

волокнами, модифицированными подходящими молекулами, такими, как антигены, антитела и лектины. Очень простым, эффективным и дешевым устройством для такого фракционирования является чашка Петри, в которую помещается полиэтиленовая рамка с натянутыми нейлоновыми волокнами (длина самых длинных волокон достигает 2,5 см). Это устройство позволяет преодолеть

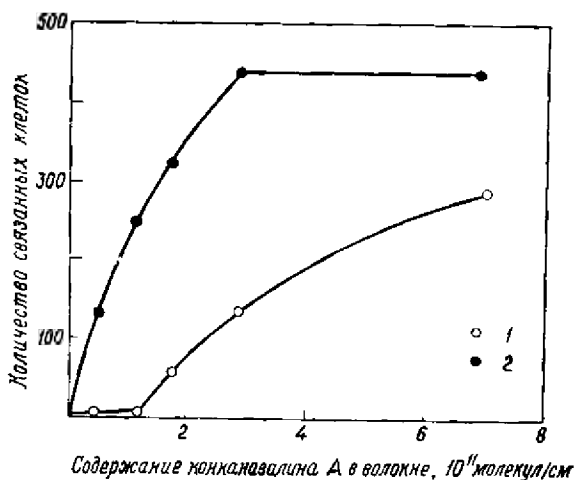


Рис. 6.17. Связывание эритроцитов (1) и тимоцитов (2) различными волокнами в зависимости от числа молекул конканавалина А на 1 см нейлонового волокна [16].

$2 \cdot 10^3$ клеток в 4 мл фосфатного буфера с солью инкубировали с различными волокнами в течение 120 мин при перемешивании в стандартных условиях. Число связанных клеток определялось микроскопическим исследованием 1 мм сегментов волокна.

многие трудности, которые возникают при разделении клеток на колонках. Фракционирование достигается либо благодаря специфическому связыванию отдельного компонента на поверхности клетки, либо вследствие различий в средстве, либо в результате неодинакового количества рецепторов с похожей специфичностью на поверхности клетки и неодинакового их распределения.

Основной принцип фракционирования с помощью волокон показан на рис. 6.16. Подходящие для этой цели молекулы или макромолекулы присоединены соответствующим химическим способом к нейлоновым волокнам, натянутым на рамку. Диссоциирующие клетки отделяют встряхиванием волокон в подходящей для диссоциации среде, а несорбированные клетки отмывают. Связанные клетки могут быть затем перенесены на волокнах в другую среду и в дальнейшем охарактеризованы или их можно получать в свободном виде в среде путем снятия их с натянутого волокна

с помощью иголки (отщепление в точках их прикрепления к волокну).

Аффинные лиганды можно присоединять к волокнам также посредством специальных связей, что позволяет освобождать клетки путем химического или ферментативного расщепления этих связей. На рис. 6.17 показано связывание эритроцитов и тимоцитов на различных волокнах в зависимости от числа молекул конканавалина А на 1 см нейлонового волокна.

В табл. 11.1 приведено также несколько примеров выделения вирусов. Наиболее часто используемыми аффинными лигандами являются связанные антитела, например выделение вируса аллелургической болезни на сефарозе с присоединенным иммуноглобулином IgG из хронически инфицированных поросят [67].

6.11. ПРОДАЖНЫЕ НЕРАСТВОРИМЫЕ АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ

Развитие аффинной хроматографии сопровождается увеличением количества продажных иммобилизованных аффинных лигандов. Для составления общей картины о применении некоторых веществ в практике аффинной хроматографии в табл. 11.1 перечислены промышленные названия носителей и иммобилизованных аффинных лигандов. Из цитированной в таблице литературы очевидно, что в настоящее время очень возросло применение продажных иммобилизованных аффинных лигандов, например конканавалина А, связанного с сефарозой (кон А — сефароза). Можно полагать, что то же ожидает и другие хроматографические материалы. Точно так же как сегодня в очень редких лабораториях готовят ДЭАЭ- и КМ-целлюлозу, совершенно закономерно, что будет постепенно увеличиваться использование продажных биоспецифических сорбентов. Это справедливо прежде всего для сорбентов с групповой специфичностью или сорбентов специфических к веществам, постоянно получаемым в лабораториях, и обусловлено специфической природой аффинной хроматографии. Из разнообразия биологически активных веществ следует, что необходим очень широкий ассортимент специфических сорбентов; поэтому много научных работников, по-видимому, будут вынуждены сами готовить специальные высокоэффективные сорбенты.

Иммобилизованные аффинные лиганды поставляют преимущественно следующие фирмы*: Miles Labs (Англия), Miles-Yeda (США), Pharmacia (Швеция), PL Biochemicals (США), Koch-

* В тексте упомянуты только фирмы, известные автору; поэтому предлагаемый перечень, конечно, неполный и его никоим образом нельзя рассматривать как рекомендацию для использования каких-либо определенных продуктов, выпускаемых конкретными фирмами.

Таблица 6.4

**Нерастворимые ферменты, производимые фирмами
Miles-Seravac и Miles-Yeda**

Фермент	Ферменты, связанные с КМ-целлюлозой(I) или ДЭАЭ-целлюлозой(II)	Содержание белка, %	Ферменты, связанные с сополимером этилена и малеинового ангидрида (ЭМА)	Содержание белка, %	Ферменты, связанные с агарозой
Трипсин	Энзайт—трипсин(I)	5—10	Энзайт ЭМА—трипсин	65—70	Энзайт—агароза—трипсин
Химотрипсин	Энзайт—химотрипсин(I)	5—10	Энзайт—ЭМА—химотрипсин	65—70	Энзайт—агароза—химотрипсин
Папаин	Энзайт—папаин(I)	5—10	Энзайт—ЭМА—папаин	60—65	Энзайт—агароза—папаин
Протеаза (<i>Streptomyces griseus</i>)	Энзайт—протеаза(I)	1—10			Энзайт—агароза—протеаза
Субтилопептидаза			Энзайт—ЭМА—субтилопептидаза А	50—55	
			Энзайт—ЭМА—субтилопептидаза В	50—55	
Лейцинаминопептидаза	Энзайт—лейцинаминопептидаза(II)	5—10			
Бромелайн	Энзайт—бромелайн(I)	5—10			
Фицин	Энзайт—фицин(I)	5—10			
Алкогольдегидрогеназа	Энзайт—YADH ^a (II)	1—5			
Глюкозооксидаза	Энзайт—глюкозооксидаза(II)	5—10			
Пероксидаза	Энзайт—пероксидаза(I)	1—10			
Рибонуклеаза	Энзайт—РНКаза(I)	5—10			
Уреаза	Энзайт—уреаза(II)	5—10			
Амилаза	Энзайт—амилаза(I)	5—10			
Цитохром с	Энзайт—цитохром(I)	5—10			

^a YADH — дрожжевая алкогольдегидрогеназа.

Light Labs. (Англия), Merck (ФРГ) и Collaborative Research (США).

В табл. 6.4 перечислены иммобилизованные ферменты, производство которых было начато до 1970 г. фирмами Miles-Seravac и Miles-Yeda. Эти фирмы производят следующие аффинные лиганды для выделения ряда биологических макромолекул:

<i>Сорбент</i>	<i>Выделяемый фермент</i>	<i>Емкость сорбента, мг/мл</i>
Агароза-ε-аминокапронил- D-триптофан—метилловый эфир	Химотрипсин	2,5
Агароза—Gly-Gly-Tyr(OBz)- Arg	Папаин	3,7
Агароза — казеин (15—20 мг/мл казеина)	Протеинкиназа	
Агароза—5'-(4-аминофе- нил)фосфорируидин-2'(3')- фосфат	Рибонуклеаза	4,7
Агароза—ингибитор трипсина	Трипсин и химотрипсин	10—14 мкмоль/мл
Агароза—л-аминофенилмер- кури(II)ацетат	Меркаптопапаин и дру- гие меркаптосоедине- ния	1—2

Для выделения специфически связывающихся белков производятся следующие препараты:

<i>Сорбент</i>	<i>Содержание аффинного лиганда</i>
Агароза—ε-аминокапронилфукозами	2,4 мг/мл
Агароза—L-фенилаланин	1—2 мг/мл
Агароза—тироксин	1,3 мг/мл
Агароза—тринодитиронин	10—14 мкмоль/мл
Агароза—L-триптофан	3—4 мкмоль/мл
Агароза—L-тирозин	3—8 мкмоль/моль

Для выделения сывороточных белков производятся следующие препараты:

<i>Сорбент</i>	<i>Соответствующий сыво- роточный белок</i>	<i>Емкость сорбента, мг/мл</i>
Агароза—L-лизин	Плазминоген	6,8 оптич. ед./мл
Агароза—анти-БСА	Бычий сывороточный альбумин	0,6
Агароза—анти-IgG (че- ловека)—агароза	Иммуноглобулин G чело- века	5

Для очистки иммуноглобулина фирма Miles производит динитрофенил—агарозу (емкость 2 мг/мл) и арсанлат—агарозу (емкость 5 мг/мл). Для очистки углеводов и гликопротеина производится СБА—агароза (агароза со связанным агглютинином соевых бобов). Производится также иммобилизованный белок, связывающий фукозу,—фукозилекс, иммобилизованный агглютинином зерен пшеницы—гликаминозилекс, иммобилизованный конканавалин А—гликозилекс. Все перечисленные сорбенты готовились путем связывания с агарозой.

Агароза со связанным конканавалином А производится также фирмой Pharmacia как кон А—сефароза. Конканавалин А связан с сефарозой 4В бромциановым методом, и его содержание составляет ~8 мг в 1 мл набухшего геля. Кон А—сефароза поставля-

ется в виде суспензии в 0,1 М ацетатном буферном растворе (рН 6), содержащем 1 моль/л хлорида натрия, по 1 моль/л хлоридов кальция, магния и марганца и 0,02% мертиолата в качестве консерванта. Гель следует хранить в холодильнике при 3—8°C.

Еще один иммобилизованный лектин поставляется фирмой Pharmacia — лектин из зерен пшеницы — сефароза 6МВ, который используется для фракционирования клеток, субклеточных частиц и растворимых углеводсодержащих молекул. Лектин привязан к микрогранулам (диаметр 200—300 мкм) сефарозы 6МВ бромциановым методом. Набухший гель содержит ~5 мг связанного лектина в 1 мл и его адсорбционная емкость по овомукоиду (молекулярная масса 28 000) составляет ~1 мг на 1 мл объема колонки. Он поставляется в виде суспензии по 10 мл седиментированного геля в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, содержащем 0,01% мертиолата в качестве консерванта. Фирма рекомендует хранить гель в холодильнике при 3—8°C. Для предотвращения диссоциации лектина на субъединицы гель не следует использовать в средах с рН < 3,5.

Для аффинной хроматографии антител типа иммуноглобулина G, иммуноглобулиновых молекул подклассов 1, 2 и 4 и их F-фрагментов поставляется носитель белок А — сефароза CL-4В. Белок А — белок клеточных стенок *Staphylococcus aureus* — состоит из одной полипептидной цепи (молекулярная масса 42 000). Характерным биологическим свойством белка А является его способность взаимодействовать с молекулами различных иммуноглобулинов G из разных видов животных. Белок ковалентно связан с сефарозой CL-4В с помощью бромцианового метода. Содержание белка 2 мг/мл и связывающая емкость для иммуноглобулина G человека ~25 мг иммуноглобулина в 1 мл геля. Если в качестве носителя используется сефароза CL-4В (т. е. агароза, сшитая 2,3-дибромпропанолом и десульфированная щелочным гидролизом в восстановительных условиях), сорбент — белок А — сефароза CL-4В — характеризуется высокой химической и механической стабильностью. Сорбент устойчив в области рН 2—11 и может выдерживать относительно высокие концентрации денатурирующих агентов, таких, как мочевины и гуанидинхлорид, а также не изменяется в присутствии хаотропных солей, таких, как 3 М роданид калия, который обычно используется для элюирования связанных молекул с имунсорбента. Гель поставляется в лиофильно высушенном виде, в него добавляются декстран и лактоза. 1 г лиофилизованного порошка эквивалентен ~3,5 мл набухшего геля. При хранении в холодильнике при 8°C этот имунсорбент сохраняет свою емкость по иммуноглобулину по крайней мере в течение двух лет.

Среди других иммобилизованных аффинных лигандов, производимых фирмой Pharmacia следует упомянуть 5'-АМР — сефаро-

зу 4В, которую получают связыванием N^6 -(6-аминогексил)-5'-АМР на сефарозе 4В бромциановым методом. Этот сорбент дает возможность проводить группоспецифическое разделение ферментов, связывающих кофакторы с общей аденилатной частью в виде 5'-АМР. К таким ферментам относятся дегидрогеназы с кофактором NADH, а также некоторые киназы с кофактором АТР. Концентрация связанного 5'-АМР составляет ~ 2 мкмоль в 1 мл набухшего геля. Для кристаллической лактатдегидрогеназы связывающая емкость равна ~ 10 мг фермента на 1 мл набухшего геля в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7) при 20°C. Гель поставляется в виде лиофильно высушенного порошка в пакетах по 5 г, что эквивалентно 20 мл набухшего геля. Порошок содержит добавки для сохранения способности геля к набуханию.

Для хроматографии рибосомальной РНК и для выделения плазминогена производится лизин—сефароза 4В путем связывания L-лизина с сефарозой 4В после активации бромцианом. Концентрация связанного лизина составляет 4—5 мкмоль на 1 мл набухшего геля. Лизин—сефароза 4В поставляется в виде лиофилизованного порошка в пакетах по 15 г, что эквивалентно 60 мл набухшего геля. Порошок содержит добавки для сохранения способности геля к набуханию. При хранении сухого геля при температурах $< 8^\circ\text{C}$ не наблюдается никакой заметной потери связанного лиганда даже через 1 год хранения.

Другим иммобилизованным аффинным лигандом является поли(U)—сефароза 4В, которая получена путем стабильной ковалентной привязки полиуридиновой кислоты [поли(U)] к сефарозе 4В после активации бромцианом. Этот метод связывания приводит к многоточечному ковалентному связыванию через таутомерные енолатные ионы нуклеотида и к не менее предпочтительной одноточечной этерификации свободной концевой фосфатной группы. Цепь из 30—40 нуклеотидов позволяет одновременно осуществлять многоточечное связывание с матрицей и связывание с полиадениловой частью информационной РНК. Благодаря своей длине эта цепь действует одновременно как пространственная группа и таким образом обеспечивает хорошую пространственную доступность при образовании комплекса. Количество связанной уридилловой кислоты составляет $\sim 0,5$ мг на 1 мл набухшего геля. Связывающая емкость равна ~ 150 мкг информационной РНК на 1 мл набухшего геля, что эквивалентно ~ 5 оптич. ед. (при использовании полисомальных препаратов из клеток KB—линии гетероплоидных клеток человеческого происхождения). Выходы информационной РНК составляют $\sim 90\%$. Поли(U)—сефароза 4В поставляется в виде лиофилизованного порошка в пакетах по 5 г, соответствующих 25 мл набухшего геля. Для сохранения способности геля к набуханию к нему добавлены лактоза

и декстрин. Через 1 год хранения лиофильно сухого порошка при температурах $< 8^{\circ}\text{C}$ теряется $\sim 2\%$ нуклеотидного материала. Однако это происходит в результате отщепления мономера от полимера, а не отщепления аффинного лиганда от матрицы.

Для выделения транспортной РНК и синтетически защищенных олигонуклеотидов используют БД-сефадекс. Это липофильное производное ДЭАЭ-сефадекса А-25, полученное бензоилированием, соответствует ~ 5 мэкв. бензоильных групп на 1 г сухого геля. Емкость по тРНК составляет ~ 20 мг на 1 мл объема колонки. Поскольку при экстремальных рН возможен гидролиз эфирных связей ароматических групп с матрицей, фирма рекомендует непосредственно перед использованием проводить промывку сорбента.

Для гидрофобной хроматографии производится октилсефароза CL-4В и фенилсефароза CL-4В. Октильная или фенильная группы вводятся в матрицу при взаимодействии сефарозы с соответствующим глицидиловым эфиром, т. е. с помощью незаряженной химически устойчивой эфирной связи. Концентрации связанных лигандов приблизительно равны для обоих гелей и составляют 40 мкмоль на 1 мл геля, что соответствует степени замещения $\sim 0,2$ моль гидрофобного заместителя на 1 моль галактозы. Связывающие способности геля зависят от экспериментальных условий и природы выделяемых белков. Для обоих гелей в 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 6,8), содержащем 1 моль/л сульфата аммония, 1 мл геля связывает ~ 15 —20 мг сывороточного альбумина человека (молекулярная масса 68 000) или 3—6 мг β -лактоглобулина (молекулярная масса 18 000). Октилсефароза CL-4В и фенилсефароза поставляются в виде суспензии, стерилизованной диэтилпиروкарбонатом, с добавкой 0,02% азида натрия. Суспензия октильного производного содержит также 25% спирта. Поскольку сорбенты приготовлены на основе сефарозы CL-4В, сшитой 2,3-дибромпропанолом и десульфированной, гели обладают очень хорошими свойствами, главными из которых являются высокая химическая и физическая устойчивость. Они устойчивы к денатурирующим агентам, таким, как мочевины и гуанидинхлорид, и могут быть использованы в органических растворителях и ионных и неионных детергентах. Фирма рекомендует хранить гели в виде суспензии в холодильнике при температурах $< 8^{\circ}\text{C}$, не прибегая к лиофильному высушиванию.

Большие количества иммобилизованных аффинных лигандов производятся также фирмой PL Biochemicals (табл. 6.5). Часто аффинный лиганд можно связать с матрицей несколькими способами; в табл. 6.5 приведены типы связывания, указывающие метод присоединения.

Тип 1. Связь образована при взаимодействии матрицы, которая может иметь или не иметь пространственную группу, непо-

средственно с аффинным лигандом с использованием сшивающего агента, такого, как карбодиймид. Специфическая точка связывания неизвестна [38].

Тип 2. Связь образована с N⁶-аминогруппой аденозинового кольца [24].

Тип 3. Связь образована с C⁸-положением аденинового кольца [24, 64].

Тип 4. Связь образована с гидроксильной группой рибозы [31].

Тип 5. Связь образована с меркаптогруппой лиганда [9].

Тип 6. Связь образуется по реакции аффинного лиганда с активированной бромцианом агарозой. Природа связи неизвестна [32, 59].

Тип 7. Связь образуется с концевым фосфатом нуклеотида обычно в виде фосфодиэфирной связи [21].

Ферменты, связанные с энзакрилами, выпускаются фирмой Koch-Light Labs. и включают α -амилазу, каталазу, α -химотрипсин, декстраназу, глюкозооксидазу, трипсин, уреазу и уриказу.

Олигодезокситимидиловую кислоту (содержит 10—12 оснований), связанную с целлюлозой, производят под названием олиго (dT) — целлюлоза T2 и олиго (dT) — целлюлоза T3 фирма Collaborative Research. Три сорта этого сорбента испытаны Бантлем и сотр. [3]; определялась адсорбционная емкость этих сорбентов по РНК из *Escherichia coli*. Олиго (dT) — целлюлоза T2 имеет наименьшую емкость и наиболее высокой базовый «шум» (по поли(А)—РНК); связывающая емкость препарата олиго (dT) — целлюлоза T3 в 2—5 раз выше, а неспецифическая сорбция ниже, чем у первого. Самым низким неспецифическим связыванием характеризуется олиго (dT) — целлюлоза T3I, который является олиго (dT) — целлюлозой, приготовленной из целлюлозы ватман CF11, промытой по методу Албертса и Геррика [1]. Олиго (dT) — целлюлоза T3 и олиго (dT) — целлюлоза T3I производятся фирмой Collaborative Research. Специфичность олиго (dT) — целлюлозы T3, оцениваемая по связыванию молекул, содержащих полиадениловую кислоту, приведена в табл. 6.6 [3].

Целлюлоза в качестве носителя для аффинных лигандов поставляется также фирмой Merck. Для выделения ряда протеиназ к сукцинизированной аминокислотоцеллюлозе присоединяют 4-аминобензамидин (90—110 мкмоль на 1 мл объема колонки), при этом объем сорбента в колонке составляет 1,2—1,4 мл на 1 г влажного сорбента. Для выделения протеиназ используют и другой иммобилизованный ингибитор, а именно ингибитор трипсина Кунитца из соевых бобов, присоединенный к сукцинизированной аминокислотоцеллюлозе (емкость по трипсину 15—20 мг на 1 мл объема колонки при объеме 1 г влажного сорбента 1,2—1,4 мл). Для аффинной хроматографии сахаров, производных сахаров и нуклеозидов используется 3-аминобензилборная кислота, присо-

Аффинные сорбенты фирмы PL Biochemicals

Лиганд	Название препарата сорбента	Содержание лиганда	Способ присоединения	Способ хранения
Кофермент	Агароза—гексан—кофермент А (тип 1)	0,5—4,0 мкмоль/мл	Реакция CoA с агароза-капроновой кислотой с использованием карбодимида	В 50%-ном глицерине при —25 °C
	Агароза—гексан—кофермент А (тип 5)	2,0—6,0 мкмоль/мл	Реакция CoA с N-оксисукцинимидным эфиром агароза—капроновой кислотой	При 4 °C в виде суспензии, содержащей 0,02% азид натрия
	Агароза—гексан—никотинамидадениндинуклеотид (тип 1)	≤3,0 мкмоль/мл	Реакция NAD с агароза—капроновой кислотой с использованием карбодимида	В 50%-ном глицерине при —25 °C
	Агароза—гексан—никотинамидадениндинуклеотид (тип 3)	1,0—4,0 мкмоль/мл	Гексаметилендиамин присоединен к NAD в C ⁸ -положении аденина перед привязкой к агарозе	То же
	Агароза—гексан—никотинамидадениндинуклеотид (тип 4)	1,0—4,0 мкмоль/мл	Периодатное окисление рибозы с последующим сшиванием гидразидом (используется дигидразид адипиновой кислоты в качестве пространственной группы)	» »
	Агароза—гексан—никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (тип 4)	1,0—4,0 мкмоль/мл	То же	» »
Лектин	Агароза — конканавалин А	6—8 мг/мл	Активация бромцианом	При 4 °C в виде суспензии, содержащей 0,02% азид натрия

Нуклеиновая
кислота

ДНК—агароза

1,0—3,0 мг/мл

Денатурированная ДНК тимуса теленка, включенная в 4%-ную агарозу

При 4 °С в виде суспензии, содержащей 0,01 М трис-HCl (pH 7,5) + 1,0 М NaCl + 1 мМ ЭДТА + + 0,02%-ный азид натрия

В виде замороженной пасты, содержащей 0,01 М трис-HCl (pH 7,5) + + 0,001 М ЭДТА + 0,15 М NaCl

То же

ДНК—целлюлоза (денатурированная ДНК)

0,5—1,5 мг/мл

Денатурированная ДНК тимуса теленка, адсорбированная на целлюлозе

ДНК—целлюлоза (нативная ДНК)

0,5—1,5 мг/мл

Нативная ДНК тимуса теленка, адсорбированная на целлюлозе

Нуклеозид

Агароза—гексан—аденозин (тип 3)

2,0—5,0 мкмоль/мл

Гексаметилендиамин присоединен к аденозину в C⁸-положении аденина перед привязкой к агарозе

При 4 °С в виде суспензии, содержащей 0,02% азид натрия

Нуклеотид

Агароза—гексан—аденозин-2',5'-дифосфат (тип 2)

2,0—5,0 мкмоль/мл

Гексаметилендиамин присоединен к 2',5'-ADP в 6-положении пурина перед привязкой к агарозе

То же

Агароза—гексан—аденозин-3',5'-дифосфат (тип 2)

2,0—5,0 мкмоль/мл

Гексаметилендиамин присоединен к 3',5'-ADP в 6-положении пурина перед привязкой к агарозе

» »

Агароза—гексан—аденозин-5'-дифосфат (тип 4)

2,0—8,0 мкмоль/мл

Периодатное окисление рибозы с последующим спшиванием гидразидом (используется гидразид адипиновой кислоты в качестве пространственной группы)

В 50%-ном глицерине при —25 °С

Агароза—гексан—аденозин-3',5'-циклофосфат (тип 3)

3,0—8,0 мкмоль/мл

Гексаметилендиамин присоединен к cAMP в C⁸-положении аденина перед привязкой к агарозе

При 4 °С в виде суспензии, содержащей 0,02% азид натрия

Лиганд	Название препарата сорбента	Содержание лиганда	Способ присоединения	Способ хранения
Нуклеотид	Агароза—гексан—аденозин-5'-фосфат (тип 2)	3,0—8,0 мкмоль/мл	Гексаметилендиамин присоединен к АМР пурина в 6-положении перед привязкой к агарозе	То же
	Агароза—гексан—аденозин-5'-фосфат (тип 3)	3,0—8,0 мкмоль/мл	Гексаметилендиамин присоединен к АМР в С ⁸ -положении аденина перед привязкой к агарозе	» »
	Агароза—гексан—аденозин-5'-фосфат (тип 4)	2,0—5,0 мкмоль/мл	Периодатное окисление рибозы с последующим сшиванием гидразидом (используется дигидразид адипиновой кислоты в качестве пространственной группы)	В 50%-ном глицерине при +25 °С
	Агароза—гексан—аденозин-5'-трифосфат (тип 4)	2,0—8,0 мкмоль/мл	То же	То же
	Агароза—гексан—уридин-5'-дифосфат (тип 4)	2,0—8,0 мкмоль/мл	» »	» »
	Агароза—гексан—уридин-5'-трифосфат (тип 4)	2,0—8,0 мкмоль/мл	» »	» »
	5'-AMP-целлюлоза (тип 7)	1,5—3,0 мкмоль/мл	Фосфодиэфирная связь между НО-группой целлюлозы и 5'-фосфатом нуклеотида (без пространственной группы)	
	5'-GMP-целлюлоза (тип 7)	1,5—3,0 мкмоль/мл	То же	
Олигонуклеотид	5' UMP-целлюлоза (тип 7)	1,5—3,0 мкмоль/мл	» »	
	Олиго(dT)-целлюлоза (тип 7)	Связывающая емкость для поли(А) 61 ед. А ₂₆₀ на 1 г	Полимеризация тимидин-5'-монофосфата на целлюлозе с N,N'-дициклогексилкарбодиимидом	В виде сухого порошка (2,5—3,5 мл/г)

	Олиго(dT)-целлюлоза (тип 7B)	Связывающая ем- кость для по- ли(А) 250 нмоль/мл	То же	Содержит 0,02% азиды нат- рия
Полинукле- отид	Агароза—полирибоадени- ловая кислота (тип 6)	0,25—1,0 мг/мл	Активация бромцианом	При 4°C в виде суспензии, содержащей 0,02% азиды натрия
	Агароза—полирибоцитиди- ловая кислота (тип 6)	0,25—1,0 мг/мл	То же	То же
	Агароза—полирибогуани- ловая кислота (тип 6)	0,25—1,0 мг/мл	» »	» »
	Агароза—полирибоинози- новая кислота (тип 6)	3,0—8,0 мг/мл	» »	» »
	Агароза—полирибоинози- новая кислота—полирибо- цитидиловая кислота (тип 6)	6—16 мг/мл	Агароза—полирибоинози- новая кислота, обработан- ная полирибоцитидиловой кислотой	При 4°C в виде суспензии, содержащей 0,1 М NaCl + + 0,02 М Na ₃ PO ₄ (рН 7,5) + 0,02% азиды натрия
	Агароза—полирибоуриди- ловая кислота (тип 6)	3,0—8,0 мг/мл	Активация бромцианом	При 4°C в виде пасты, со- держащей 0,02% азиды натрия
Субстрат или ингибитор протеазы	Агароза—полирибоуриди- ловая кислота (тип 6А)	0,5—1,0 мг/мл	То же	То же
	Агароза—гемоглобин	2,0—6,0 мг/мл	» »	В 50%-ном глицерине при —20°C
Тиол	Агароза—ингибитор трипси- на из бобовых лимы	2,0—6,0 мг/мл	» »	То же
	Агароза—ингибитор трипси- на из соевых бобов	2,0—6,0 мг/мл	» »	» »
	Агароза—цистеамин	1,0—5,0 мкмоль/мл SH-групп	» »	При 4°C в виде суспензии, содержащей 0,02% азиды натрия
	Агароза—гексан—тиол	4,0—10,0 мкмоль/мл SH-групп	Взаимодействие тиолактона N-ацетилгомоцистеина с аминогексан—агарозой	То же

Таблица 6.6

**Специфичность связывания олигодезокситимидилат—целлюлозой (ТЗ)
молекул, содержащих полиадениловую кислоту^a**

Нуклеиновая кислота	Связывание, %
Гомополимер полиадениловой кислоты	97
Гомополимер полиуридилловой кислоты	1
Полнуридилловая кислота—поли(А)триплекс	1
Разрезанная однонитевая ДНК	0,1
Разрезанная двуниевая ДНК	0,3
4S РНК из <i>E. coli</i>	0,2
Полиадениловая кислота информационной РНК	98,7

^a ³H-меченные нуклеиновые кислоты наносили на предварительно отмытые колонки, приготовленные из 0,25 г олигодезокситимидилат—целлюлозы. Во всех случаях наносили <1 мкг (что соответствовало от 5 000 до 15 000 имп./мин) нуклеиновых кислот.

единения к сукцинизированной аминокислотецеллюлозе (90—110 мкмоль/мл, если в колонке на 1,2—1,4 мл находится 1 г влажного сорбента). Ввиду того что 3-аминобензилборная кислота функционирует также в качестве ингибиторов сериновых протеиназ, фирма рекомендует упомянутое производное целлюлозы в качестве специфического сорбента для выделения субтилизина и других бактериальных сериновых протеиназ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alberts B., Herrick G., Methods Enzymol., 21D, 198—217 (1971).*
2. *Anfinsen C. B., Bose S., Corley L., Gureri-Rotman D., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 2139—3142 (1974).*
3. *Bantle J. A., Maxwell I. H., Hehn W. E., Anal. Biochem., 72, 413—427 (1976).*
4. *Berg R. A., Prockop D. J., J. Biol. Chem., 248, 1175—1182 (1973).*
5. *Berglund O., Eckstein F., Eur. J. Biochem., 28, 492—496 (1972).*
6. *Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M., Methods Enzymol., 34, 531—544 (1974).*
7. *Comer M. J., Creven D. B., Harvey M. J., Atkinson A., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 55, 201—209 (1975).*
8. *Cuatrecasas P., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 69, 1277—1281 (1972).*
9. *Cuatrecasas P., Parikh I., Biochemistry, 11, 2291—2299 (1972).*
10. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 235—239 (1968).*
11. *De Larco I., Guroff G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 486—492 (1973).*
12. *Deutsch D. G., Fogelman D. J., von Kaulla K. N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 758—764 (1973).*
13. *Di Prisco G., Casola L., Biochemistry, 14, 4679—4683 (1975).*
14. *Doyle R. J., Birdsall D. C., Young F. E., Prep. Biochem., 3, 13—18 (1973).*
15. *Edelman M., Methods Enzymol., 34, 499—502 (1974).*
16. *Edelman G. M., Rutishauser U., Methods Enzymol., 34, 195—225 (1974).*

17. Egorov T. A., Spenson A., Ryden L., Carlsson J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **72**, 3029—3033 (1975).
18. Ersson B., Aspberg K., Porath J., Biochem. Biophys. Acta, **310**, 446—452 (1973).
19. Ersson B., Porath J., FEBS Lett., **48**, 126—129 (1974).
20. Fritz H., Gebhardt B. M., Fink E., Schramm W., Werle E., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., **350**, 129—138 (1969).
21. Gilham P. T., Biochemistry, **7**, 2809—2813 (1968).
22. Gilham P. T., Robinson W. E., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4985—4989 (1964).
23. Gospodarowicz D., J. Biol. Chem., **247**, 6491—6498 (1972).
24. Guilford H., Larsson P. O., Mosbach K., Chem. Scr., **2**, 165—170 (1972).
25. Haugen T., Ishaque A., Chatterjee A. K., Preiss J., FEBS Lett., **42**, 205—208 (1974).
26. Helman M., Givol D., Biochem. J., **125**, 971—974 (1971).
27. Horejsi V., Kocourek J., Methods Enzymol., **34**, 361—367 (1974).
28. Kato Y., Saito T., Hashimoto T., Shimizu A., J. Chromatogr., **134**, 204—206 (1977).
29. Kristiansen T., Methods Enzymol., **34**, 331—341 (1974).
30. Krug F., Desbuquois B., Cuatrecasas P., Nature New Biol., **234**, 268—270 (1971).
31. Lamed R., Levin Y., Wilchek M., Biochim. Biophys. Acta, **304**, 231—235 (1973).
32. Lindberg U., Persson T., Eur. J. Biochem., **31**, 246—254 (1972).
33. Lindberg U., Persson T., Methods Enzymol., **34**, 496—499 (1974).
34. Lis H., Lotan R., Sharon N., Methods Enzymol., **34**, 341—346 (1974).
35. Lowe C. R., Dean P. D. G., Affinity chromatography, Wiley, New York, London, 1974, p. 272.
36. Matthews N., Rolland J. M., Nairn R. C., J. Immunol. Methods, **9**, 323—335 (1976).
37. Mosbach K., Biochem. Soc. Trans., **2**, 1294—1296 (1974).
38. Mosbach K., Guilford H., Ohlsson R., Scott M., Biochem. J., **127**, 625—631 (1972).
39. Murphy R. F., Imam A., Hughes A. E., McGucken M. J., Buchanan K. D., Conlon J. M., Elmore D. T., Biochim. Biophys. Acta, **420**, 87—96 (1976).
40. Murthy B. J., Hercz A., FEBS Lett., **32**, 243—246 (1973).
41. Myerowitz R. L., Hanzel Z. T., Robbins J. B., Clin. Chim. Acta, **39**, 307—317 (1972).
42. Myerowitz R. L., Chrambach A., Rodbard D., Robbins J. B., Anal. Biochem., **48**, 394—409 (1972).
43. O'Carra P., Biochem. Soc. Trans., **2**, 1289—1293 (1974).
44. Ozawa T., Okumura M., Yagi K., Biophys. Biophys. Res. Comm., **65**, 1102—1107 (1975).
45. Parikh I., Cuatrecasas P., Methods Enzymol., **34**, 610—619 (1974).
46. Pemberton R. E., Liberti P., Baglioni C., Anal. Biochem., **66**, 18—28 (1975).
47. Pittar C. C., Charm S. E., Green S., Biotechnol. Bioeng., **17**, 607—611 (1975).
48. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Nature (London), **258**, 598—599 (1975).
49. Schaller H., Nüsslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzschmann I., Eur. J. Biochem., **26**, 474—481 (1972).
50. Schott H., Eckstein H., Bayer E., J. Chromatogr., **99**, 31—34 (1974).
51. Schott H., Eckstein H., Gattfield I., Bayer E., Biochemistry, **14**, 5541—5548 (1975).
52. Schott H., Rudloff E., Schmidt P., Roychoudhury R., Kössel H., Biochemistry, **12**, 932—938 (1973).
53. Sprinzl M., Scheit K. H., Sternbach H., Von der Haar F., Cramer F., Biochem. Biophys. Res. Comm., **51**, 881—887 (1973).

54. Tosa T., Sato T., Sano R., Yamamoto K., Metuo Y., Chibata I., *Biochim. Biophys. Acta*, **334**, 1—11 (1974).
55. Turková J., Bláha K., Valentová O., Čoupek J., Seifertová A., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 586—593 (1976).
56. Turková J., Hubáková O., Křiváková M., Čoupek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 1—9 (1973).
57. Turková J., Vavreinová S., Křiváková M., Čoupek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 503—508 (1975).
58. Vavreinová S., Turková J., *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 506—513 (1975).
59. Wagner A. F., Bugianesi R. L., Shen T. Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 184—189 (1971).
60. Wetekam W., Mullinix K. P., Deeley R. G., Kronenberg H. M., Eldridge J. D., Meyers M., Goldberger R. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **72**, 3364—3368 (1975).
61. Wilchek M., *FEBS Lett.*, **7**, 161—163 (1970).
62. Wilchek M., *Advan. Exp. Med. Biol.*, **42**, 15—31 (1974).
63. Wilchek M., Gorecki M., *FEBS Lett.*, **31**, 149—152 (1973).
64. Wilchek M., Salomon Y., Lowe M., Selinger Z., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 1174—1184 (1971).
65. Wilcox G., Clementson J., *Methods Enzymol.*, **34**, 368—373 (1974).
66. Winquist L., Eriksson L. C., Dallner G., *FEBS Lett.*, **42**, 27—31 (1974).
67. Yoon J. W., Kenyon A. J., Good R. A., *Nature New Biol.*, **245**, 205—207 (1973).
68. Yoshida A., *J. Chromatogr.*, **114**, 321—327 (1975).

Гидрофобная хроматография, ковалентная аффинная хроматография, аффинное элюирование и родственные методы

К методам аффинной хроматографии относятся наряду с биоспецифической аффинной хроматографией также гидрофобная хроматография, ковалентная хроматография, аффинное элюирование, аффинная пертурбация плотности, аффинный электрофорез и металлохелатная хроматография [26, 29]. Все эти методы имеют много общих черт; это касается также и типичной биоспецифической аффинной хроматографии. Как правило, они основаны на образовании специфических комплексов биологически активных веществ, причем один из компонентов в комплексе иммобилизован на нерастворимой матрице. Методы приготовления специфических сорбентов практически идентичны; общими являются такие проблемы, как влияние нерастворимого носителя и пространственная доступность иммобилизованного лиганда. Часто трудно определить, имеет ли место типичное биоспецифическое связывание или все же преобладают неспецифические гидрофобные взаимодействия, например если сорбция происходит на носителе, модифицированном гидрофобной пространственной группой. Тем не менее можно ожидать, что по крайней мере некоторые из перечисленных разовьются в самостоятельные методы, особенно гидрофобная хроматография, которая использует нековалентные взаимодействия гидрофобных участков на поверхности белковых молекул с гидрофобными лигандами, связанными с нерастворимыми носителями. Однако на таких сорбентах можно также разделять низкомолекулярные вещества, например пептиды. Изучение влияния концентрации подходящего связанного лиганда и нахождение оптимальных концентраций солей в ходе сорбции и десорбции могут привести к тому, что гидрофобная хроматография наряду с тель- и ионообменной хроматографией станет стандартным методом очистки различных типов соединений.

7.1. ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Согласно Шальтье [48], гидрофобная хроматография была первым из используемых методов очистки белков и других биологических молекул. Для целей разделения можно использовать агарозу, модифицированную, например, углеводородами, образуя-

шими гомологические ряды $(X(CH_2)_nNH - \text{сефароза, где } X = H, NH_2, COOH, OH, C_6H_5 \text{ и т. д.})$. Каждый член ряда обеспечивает лиганд гидрофобной «ножкой» или «мерной линейкой» различного размера и протяженности, которая взаимодействует с доступными гидрофобными «карманами» или гидрофобными участками различных белков. Задержка или удерживание белков на сорбенте достигается благодаря липофильным взаимодействиям между этими «карманами» и достаточно большими углеводородными боковыми цепями на нерастворимом носителе. Шальтье [48] исходил в своих предположениях из следующих наблюдений:

1. Ряд алкилагароз со структурой $CH_3(CH_2)_nNH - \text{сефароза}$ (где n принимает значения от 0 до 7), ω -аминоалкилагароз со структурой $NH_2(CH_2)_nNH - \text{сефароза}$ (где n — от 2 до 8) характеризуется близким содержанием алкильных боковых цепей на гранулу геля [15, 49]. В одинаковых условиях (рН, ионная сила, состав буферного раствора и температура) способность $CH_3(CH_2)_nNH - \text{сефарозы}$ удерживать фосфорилазу b зависит от длины углеводородных цепей. При хроматографии на производных сефарозы ($n=0$ или 1) фосфорилаза b выходила из колонки с фронтом растворителя; при $n=2$ происходила задержка фермента, а при $n=3$ фермент адсорбировался. Элюирование фосфорилазы b с модифицированной сефарозы ($n=3$) возможно с помощью «деформирующих» буферных растворов, которые, как было показано, приводят к обратимым структурным изменениям фермента. На производном сефарозы с $n=5$ связывание фосфорилазы было настолько сильным, что фермент не элюировался с колонки, даже когда рН деформирующего буферного раствора понижался до 5,8, хотя деформирующая способность такого буфера намного выше. Освободить фосфорилазу b из комплекса с этим производным можно только в неактивной форме после промывки колонки 0,2 М уксусной кислотой. Сама агароза содержит отрицательные заряды, а связывание алкил- или ариламинов на активированной бромцианом агарозе вводит в гель положительные заряды (разд. 8.2.4). В связи с этим Иост и др. [28] обращали внимание на то, что на сефарозе с алкиламинами, прикрепленными после предварительной активации носителя бромцианом, связывание белков происходит большей частью при рН выше изоэлектрической точки выделяемых белков. Поэтому допускалось, что в этих случаях электростатические взаимодействия с положительно заряженной N-замещенной изомочевинной более существенны для связывания, чем гидрофобные взаимодействия с гидрофобной боковой цепью. Тем не менее гранулы агарозы не связывают фосфорилазу b , пока к ним не будут прикреплены алкильные боковые цепи некоторой минимальной длины. Кроме того, отмеченные выше заряды в равной мере присутствуют во всех членах гомологического ряда, и, следовательно, они не могут быть причиной различий в степени

задержки на колонке, которая обусловлена главным образом длинной гидрофобной цепи.

2. Поскольку нет никакого подобия между четырехуглеродной алкильной группой в цепи алкилагарозы и известными субстратом или эффектором фосфорилазы *b* и поскольку в тех же условиях на этом типе колонок связываются также и другие белки, то такое взаимодействие с носителем, по-видимому, объясняется не только связыванием в каталитическом или регуляторном центрах. Тот факт, что некоторые ферменты сохраняют свою каталитическую активность даже после сорбции на гидрофобном сорбенте, также согласуется с этим предположением.

3. Белки с одинаковым зарядом и молекулярной массой для удерживания на алкилагарозных колонках требуют «ножек» различной длины.

4. Связываемость данного белка увеличивается до определенного предела с удлинением гидрофобной «ножки»; это показано десорбцией белка с колонки, для которой необходимы жесткие условия.

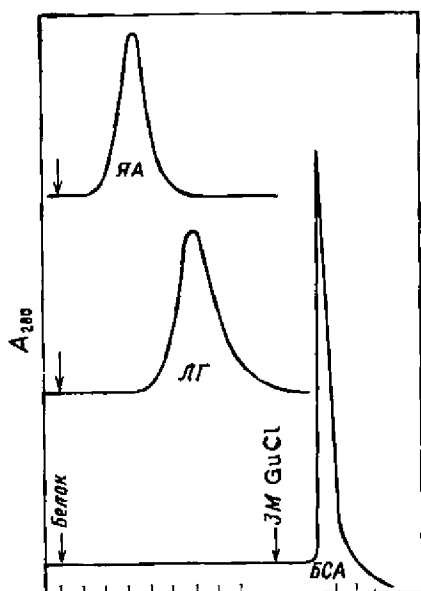
5. Белки, связанные в колонке с алкилагарозой, можно десорбировать, повышая гидрофобность элюента.

На картину элюирования с алкилагароз сильно влияют ионные взаимодействия, которые, однако, не обязательно приводят к повышению аффинности колонки, а скорее вызывают обратное. Например, гликогенфосфорилаза *b* удерживается, как уже отмечалось, на алкилагарозе, которая содержит четыре углеродных атома в цепи. В ряду ω -аминоалкилагароз фермент удерживается только на шестиуглеродной боковой цепи. Подобным образом гликогенсинтетаза связывается с CH_3NH сефарозой, в то время как в ряду ω -аминоалкилсефароз существенное связывание наблюдается на $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}$ — сефарозе.

Введение заряженной группы в конец углеводородной цепи не только приводит к появлению ионных взаимодействий, но и уменьшает, кроме того, гидрофобные свойства колонки. В некоторых случаях сорбированные белки можно освободить из комплекса с алкилагарозами путем увеличения ионной силы элюента или путем изменения его pH. В этих случаях Шальтье считает возможным, что ионные взаимодействия прямо ответственны за сорбцию макромолекул на модифицированной агарозе. В белках, конформационное и агрегационное состояния которых сильно зависят от внутримолекулярных ионных взаимодействий, вероятно, ионная сила и pH влияют на структуру молекулы и поэтому изменяют размер и доступность их гидрофобных «карманов».

Предположение, что гидрофобные взаимодействия играют ключевую роль в разделении, достигаемом на агарозах ω -аминоалкильного ряда, подтверждено несколькими наблюдениями. Во-первых, для освобождения некоторых белков, удерживаемых этими

колонками, недостаточно сведения к минимуму ионных взаимодействий применением элюентов с высокой концентрацией ионов. Например, белок J из *Salmonella typhimurium*, который при pH 7,0 заряжен отрицательно, фактически не задерживается в ω -аминоалкилагарозах при низкой ионной силе даже несмотря на то, что при этом pH эти агарозы заряжены положительно. Хоф-



Объем элюирования, мл

Рис. 7.1. Хроматография липофильных белков на капиллидагид-агарозе [32].

Хроматографические исследования проводились в колонках (90×16 мм) с гелями 4%-ной агарозы, содержащими 5,5 мэкв/м. каприлата. Гели промывались 0,05 M Na-ацетатным буфером (pH 6,0). Введение белков (5—10 мг) указано стрелками. Скорость потока постоянна и равна 43 мл/ч. Регистрировалась оптическая плотность элюатов при 280 нм. Для целей сравнения были осуществлены три отдельных хроматографирования. ЯА — яичный альбумин, ЛГ — лактоглобулин, БСА — бычий сывороточный альбумин, GuCl — гуанидинхлорид.

элюирования, наблюдаемый при разделении белков на ω -аминоалкилагарозах, отличается от элюирования с ДЭАЭ-целлюлозы, на которой разделение белков основано на ионных взаимодействиях. Тем не менее именно ДЭАЭ-целлюлоза, содержащая диэтиламиноэтильные группы, может действительно представлять особый случай смешанного ионного и гидрофобного сорбента. Эти особенности ДЭАЭ-целлюлозы могут объяснить наблюдаемые иногда отклонения в связывании белков ионообменником, например связывание в «неправильной» (относительно изоэлектрической точки) области pH. Более того, ряд ω -аминоалкилсефароз демонстрирует различную степень удерживания специфических белков, связанную с увеличением длины ω -аминоалкильных цепей. Этот факт подобен тому, который наблюдался в ряду алкилагароз.

Хофсти [22] показал, что белки значительно отличаются по своей гидрофобности, которая может быть измерена на основании

Таблица 7.1

Адсорбция белка как функция концентрации аффинного лиганда^а

Белок ^б	Адсорбция белка при концентрации (мкэкв/мл) лиганда		
	5,5	2,7	1,5
Бычий сывороточный альбумин	Связывается	Задерживается	Не связывается
β -Лактоглобулин	Задерживается	Не связывается	Не связывается
β -Лактоглобулин + + 3 М NaCl	Связывается	Слабо задерживается	Не связывается

^а Термин «связывается» означает, что $V_e \gg V_S$. «задерживается» — $V_e > V_S$, а «не связывается» — $V_e = V_S$.

^б В виде раствора в 0,05 М ацетате натрия (рН 6,0).

их адсорбции на гидрофобных гелях. Нишикава и Бейлон [32] подтвердили наблюдение Хофсти, что для трех тестируемых белков порядок возрастания гидрофобности следующий: овальбумин < β -лактоглобулин < бычий сывороточный альбумин; данные получены на неионном гидрофобном геле (сефароза 4В со связанным каприлгидразидом). Из рис. 7.1 следует, что 4%-ный гель агарозы, содержащий 5,5 мкэкв. каприлата в 1 мл, связывает бычий сывороточный альбумин очень сильно и для его десорбции требуется 3 М гуанидинхлорид; β -лактоглобулин отстаёт от фронта растворителя в своем движении через сорбент, в то время как овальбумин элюируется без отставания.

В табл. 7.1 [32] дана адсорбция бычьего сывороточного альбумина и β -лактоглобулина как функция содержания каприлгидразида в 1 мл сефарозы 4В. Поскольку тестируемые белки отличаются своими гидродинамическими размерами, для оценки их хроматографического поведения сопоставляются экспериментально определяемые объемы элюирования V_e и V_S , т. е. объемы элюирования белка с колонок, предварительно уравновешенных 2 М гуанидинхлоридом. В этом растворе все белки движутся и не задерживаются сорбентом.

Чувствительность адсорбции бычьего сывороточного альбумина к небольшим изменениям концентрации лиганда может быть следствием одновременных взаимодействий сорбента с множеством участков на белковой молекуле. Для β -лактоглобулина влияние концентрации лиганда более выражено, если в буферном растворе присутствовал 3 М хлористый натрий. Высаливающее действие хлорида натрия известно, поэтому присутствие этой соли повышает адсорбцию β -лактоглобулина на гидрофобном сорбенте.

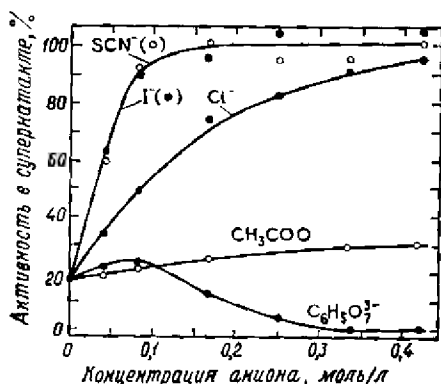
Обсуждая влияние солей, следует отметить, что фракционирование белков основано на гидрофобной высаливающей адсорбции на неионных амфифильных гелях, для которой Порат и др. ввели термин «гидрофобная высаливающая хроматография». Амфифильные гели получают при введении ограниченного количества гидрофобных групп в вещества, которые используются как гидрофильные гели, при этом образуются сшитые полимеры, обладающие высокой проницаемостью и способные набухать как в воде, так и во многих органических растворителях. В водных растворах они проявляют сродство к растворенным гидрофобным веществам и соединениям с гидрофобными группами. Они не содержат ионных групп в отличие от сорбентов, приготовленных на основе агарозы присоединением алифатических аминов, триптофана и его эфиров и т. п. Следовательно, неионные амфифильные гели демонстрируют «чистое» гидрофобное взаимодействие с гидрофобными областями на поверхности белковых молекул или других растворенных веществ вместо смешанной ионно-гидрофобной адсорбции производных агарозы. В определенных условиях адсорбционная емкость амфифильных гелей по белкам может быть очень высока. В качестве примера Порат и др. [40] приводят хроматографию экстракта фасоли на бензильном эфире сефарозы 6В. В присутствии 3М хлористого натрия сорбция экстракта и элюирование отдельных фракций осуществляется путем повышения pH, снижения ионной силы и уменьшения полярности растворителя. После использования этой колонки более 20 раз и с 50-кратным количеством белка (относительно сухого веса геля) гидрофобный сорбент не изменяет своих хроматографических свойств. Принцип, который лежит в основе высаливающей адсорбции, до конца не ясен. Очевидно, главной движущей силой является возрастание энтропии вследствие изменения структуры воды, окружающей гидрофобные группы. Гидрофобная хроматография может иметь преимущества в растворах с высокой ионной силой, которые используются при выделении нестабильных ферментов, например α -изопропилмалатизомеразы [4], требующих для стабилизации высоких концентраций солей.

Из вышеизложенного следует, что в гидрофобной хроматографии необходимо делать различие между сорбентами только с гидрофобными группами и сорбентами, содержащими наряду с гидрофобными также ионные группы. К носителям последнего типа Хертен [21] относит также бензоилированную ДЭАЭ-целлюлозу (предложена Гиллемом и др. [18] для фракционирования транспортных РНК), полиакриловую кислоту со связанными алифатическими аминами (использована для хроматографии митохондриальных мембранных белков [61]) и сукцинированную аминодецилаггарозу (использована Ионом [63] для очистки транскарбамиллазы). Эти и другие подобные примеры перечислены в

табл. 11.1, которая включает также выделение β -галактозидазы на сефарозе 4В со связанным после активации бромцианом *n*-пропиламином [41]. На рис. 7.2 показано влияние концентрации различных анионов на сорбцию β -галактозидазы на этом сор-

Рис. 7.2. Влияние нейтральных солей на адсорбцию [41].

100 мкл суспензии тримстиледиами-сефарозы 4В, на которой уже адсорбировалась β -галактозидаза (0,24 ед./мл), добавлялись к 0,5 мл стандартного буфера 10,01 М трис-ацетат (рН 7,1), содержащий 0,1 моль/л NaCl, 0,01 моль/л $MgCl_2$ и 0,01 моль/л β -меркаптоэтанол] вместе с раствором, содержащим 0,1 М NaCl и различные концентрации нейтральных солей (рН, если требовалось, доводили до 7,1). Использовались соли калия; на рисунке указаны только анионы. После 15 мин инкубации при комнатной температуре в супернатанте, полученном фильтрованием, определяли ферментативную активность. Активность дана в процентах к исходной адсорбированной активности.



бенте. Большое влияние оказывает природа анионов, которые могут быть расположены в следующий ряд по создаваемому ими эффекту уменьшения десорбции: роданид=иодид>хлорид>ацетат>нитрат. Этот ряд идентичен гофмейстеровскому лиотропному ряду для нейтральных солей [19]. Влияние анионов на адсорбцию белков на алкилсефарозе очень близко лиотропным, а не чисто электростатическим эффектам.

Таблица 7.2

Активность ферментов метаболизма гликогена, которая может быть элюирована растворами соли в различных концентрациях с метиламином—сефароз, характеризующихся возрастающей гидрофобностью

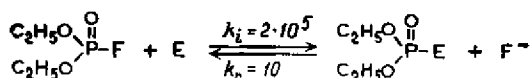
Содержание NaCl в буферных растворах, используемых для ступенчатого элюирования, моль/л	Содержание метиламина в сефарозе, мкмоль/мл	Активность, единиц на 1 мл сефарозы ^a				
		фосфо-ри-лаза b	киназа фосфо-ри-лазы	фосфатаза фосфо-ри-лазы	протеин-киназа	гликоген-синтетаза
0,050	5,7	—	6,5	—	—	—
	12,1	0,8	301	0,12	0,147	21,7
	20,0	0,65	6554	2,0	1,4	146
	32,5	32,0	353	0,3	0,014	32,0
0,12	5,7	—	—	—	—	—
	12,1	—	7,3	—	—	—
	20,0	—	2839	1,6	1,2	58,0
	32,5	16,0	1304	1,8	0,04	35,0
I	5,7	—	—	—	—	—
	12,1	—	3,6	—	—	—
	20,0	—	210	1,2	0,09	12,0
	32,5	14,0	6666	16,6	4,2	161

^a Тире указывают, что активность ферментов не обнаруживается в элюате.

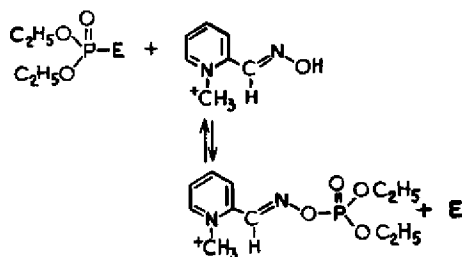
Данные, приведенные в табл. 7.2, иллюстрируют влияние концентрации соли на ступенчатое элюирование ферментов метаболизма гликогена с различных метиламин — сефароз, характеризующихся возрастающей гидрофобностью [27].

7.2. КОВАЛЕНТНАЯ АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Избирательное выделение биологически активных макромолекул аффинной хроматографией основано на обратимых взаимодействиях между иммобилизованным аффинным лигандом и свободной макромолекулой. Однако принцип аффинной хроматографии может быть также использован даже с сорбентом, который содержит «необратимый» ингибитор, когда после сорбции комплементарной макромолекулы в специфическом комплексе образуется ковалентная связь. Для освобождения выделяемого вещества из комплекса с аффинным сорбентом используют подходящую химическую реакцию. Пример ковалентной аффинной хроматографии — выделение ацетилхолинэстеразы с помощью иммобилизованных органофосфатов [1, 56]. Ацетилхолинэстераза принадлежит сериновым эстеразам, для которых типично ингибирование связыванием с органофосфатами или органофосфонатными эфирами, содержащими легко отщепляемую группу, например,

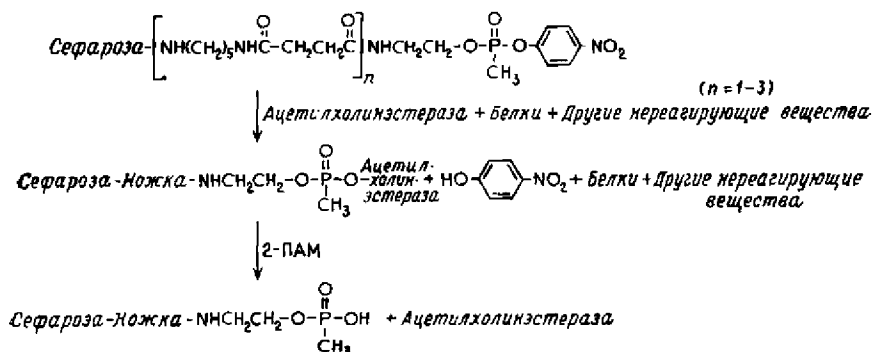


Реакция обратима, но равновесие сильно смещено вправо, как это следует из величин констант скорости второго порядка ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}$) для ацетилхолинэстеразы из электрического угря. Следовательно, реакция обычно протекает в одном направлении. Гидроксильная группа активного серина является нуклеофилом фермента, и эта группа ацетируется в ходе гидролиза ацетилхолина. Фосфорилированный фермент относительно устой-



чив и гидролизуется в водном растворе крайне медленно. Однако при добавлении в раствор сильного нуклеофила, такого, как N-метилпиридиний-2-альдоксим (2-МПА), последний очень быстро реагирует с ингибированным ферментом с освобождением фермента.

Выделение ацетилхолинэстеразы на ковалентном аффинном носителе проводится по следующей схеме:



На первой стадии колонка должна быть обработана смесью ацетилхолинэстеразы и других белков. Ацетилхолинэстераза и другие сериновые эстеразы связываются ковалентно, а непрореагировавшие белки отмываются с колонки. На второй стадии колонка обрабатывается раствором 2-МПА, избирательно отщепляющим ацетилхолинэстеразу. Аффинный носитель связывает ацетилхолинэстеразу, химотриксин и, возможно, и другие сериновые эстеразы, которые быстро реагируют с лигандом. Для отщепления фермента, ковалентно связанного с ингибитором, можно использовать фториды, но для практических целей применяют более активные нуклеофилы, например уже упомянутый N-метилпиридиний-2-альдоксим. При низкой скорости потока, которая позволяет ферменту оставаться в контакте с иммобилизованным «необратимым» ингибитором с концентрацией ~ 20 мкмоль/л в течение по крайней мере 3 мин, весь фермент связывается. Такое взаимодействие соответствует реакции второго порядка с константой скорости $> 10^5$ л·моль $^{-1}$ ·мин $^{-1}$. Если фермент полностью заингибирован органофосфатом перед его нанесением на аффинный сорбент, ацетилхолинэстераза совсем не адсорбируется на колонке. Емкость ковалентной аффинной колонки весьма высока. Если концентрация связанного аффинного лиганда в геле равна 0,2 ммоль/л, то 1 мл геля связывает 0,1 мкмоль химотрипсина, т. е. 2,5 мг белка. На колонке с 1 мл геля можно получить 1 мг ацетилхолинэстеразы при концентрации связанного с сефарозой ингибитора 0,5 ммоль/л.

Другой пример ковалентной хроматографии, а именно тиолдисульфидный обмен, применяемый для выделения белков и пептидов со свободными SH-группами, уже рассмотрен в разд. 6.6.

Бламберг и Строминджер [5, 6] применили ковалентную аффинную хроматографию для выделения пенициллинсвязывающих компонентов мембран из солюбилизованных мембран *Bacillus subtilis*. Мембраны солюбилизовались с помощью 2%-ного нонидета Р-40 и экстракт сорбировался на 6-аминопеницилланат — сефарозе одноразовым методом при комнатной температуре. Пенициллинсвязывающие компоненты образуют ковалентную связь с пенициллином, которая, по-видимому, является тиоэфирной связью между остатком цистеина белка и карбонильной группой β -лактамного кольца пенициллина. Пенициллинферментная связь может быть затем расщеплена при помощи мягкой обработки гидроксиламином в нейтральной среде. Ферменты, полученные таким способом, главным образом D-аланинкарбоксипептидаза из *Bacillus subtilis*, полностью сохраняют свою ферментативную активность. Примеры выделения веществ при помощи ковалентной аффинной хроматографии также даны в табл. 11.1.

7.3. АФФИННОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Другим методом аффинной хроматографии, использующим образование специфического комплекса макромолекулы выделяемого вещества с аффинным лигандом, является биоспецифическое элюирование с неспецифических сорбентов; этот метод известен как «аффинное элюирование» и в некоторых случаях как «специфическое элюирование субстратом» [54]. В основе метода лежит неспецифическое связывание, например, смеси ферментов полимером, который несет на себе функциональные группы, взаимодействующие с ферментами. Требуемый фермент затем специфически элюируют раствором субстрата, ингибитора или какого-либо другого аффинного лиганда.

В методе аффинного элюирования наиболее часто используемыми полимерами являются ионообменники. Если сорбируемая молекула связывается с помощью групп, расположенных в связывающем участке фермента, то любой ионообменник может рассматриваться в качестве аффинного полимера, содержащего «общие лиганды». Когда образуется комплекс белка со свободным аффинным лигандом, заряженные группы в его связывающих центрах становятся защищенными от взаимодействия с ионообменником. Это защита может быть обусловлена стерическими факторами или, в наиболее благоприятных ситуациях, нейтрализацией противоположными зарядами на аффинном лиганде. Если различия в доступности заряженных групп в ферменте и в комплексе фермент — аффинный лиганд значительны, то фермент

может быть связан в таких условиях (рН и ионная сила), когда комплекс фермент—аффинный лиганд не связывается. Трудно определить заранее степень, до которой должен быть изменен заряд фермента, чтобы предотвратить его связывание на сорбенте. Максимальное число зарядов на аффинном лиганде, необходимое для предотвращения связывания фермента с ионообменником, равно четырем для очистки фруктозо-1,6-дифосфатазы элюированием фруктозо-1,6-дифосфатом, трем для выделения изоцитратдегидрогеназы элюированием изоцитратом натрия или цитратом натрия и двум для элюирования глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы глюкозо-6-фосфатом. Поскольку наиболее эффективными аффинными лигандами для элюирования являются те, которые содержат заряженные группы, идентичные заряду ионообменника (положительно заряженные группы в случае анионообменников и отрицательные в случае катионообменников), было высказано предположение, что десорбция обусловлена различием в суммарном заряде на свободном ферменте и в заряде комплекса фермент—аффинный лиганд. Теоретически, однако, даже нейтральный лиганд может привести к десорбции фермента, если заряженные группы, ответственные за адсорбцию, расположены в участке, связывающем аффинный лиганд, и если после образования комплекса они стерически защищаются от взаимодействия с ионообменником или если происходят конформационные изменения, которые предотвращают взаимодействие заряженных групп с ионообменником [54, 55].

Наряду с различиями в зарядах фермента и фермент-субстратного комплекса на эффективность элюирования влияют также сила связи между ферментом и ионообменником и сродство фермента к аффинному лиганду. Имеют место взаимозависимые равновесия фермента Е, связанного с ионообменником IЕ [уравнение (7.1)], и фермента, связанного с лигандом L в растворе [уравнение (7.2)]:

$$K_1 = \frac{[E \cdot IE]}{[E][IE]}, \quad (7.1)$$

$$K_2 = \frac{[EL]}{[E][L]}, \quad (7.2)$$

$$[EL] = \frac{K_2 [L][E \cdot IE]}{K_1 [IE]}. \quad (7.3)$$

В этом случае ионообменник рассматривается как макромолекула, содержащая конечное число связывающих участков. Это предположение является верным для данных конкретных условий, а именно при данных рН, ионной силе и определенном (точно известном) количестве фермента, связывающегося с полимером. Поскольку K_1 непрерывно уменьшается с ростом ионной силы

Таблица 7.3

Применение аффинного элюирования для выделения ферментов

Выделяемые ферменты	Аффинный лиганд для элюирования	Сорбент	Литература
Альдолаза	Фруктозо-1,6-дифосфат	КМ-целлюлоза	34, 35
Аминоацил-тРНК-синтетазы	тРНК	Фосфоцеллюлоза	53
Аминоацил-тРНК-синтетазы (аргининовая, гистидиновая, изолейциновая, лейциновая, лизиновая, фенилаланиновая, сериновая, треониновая, тирозиновая и валериановая кислоты)	Нефракционированная тРНК	Фосфоцеллюлоза	54
Амилаза из <i>Pseudomonas saccharophila</i>	Растворимый крахмал	Нерастворимый крахмал	51
Дифосфопиридиннуклеотидспецифичная изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41)	Цитрат	Фосфоцеллюлоза	2
Фруктозо-1,6-дифосфатаза (КФ 3.1.3.11) из	Фруктозо-1,6-дифосфат	КМ-целлюлоза	34—38, 45
печени кролика			
мышцы кролика	»	Фосфоцеллюлоза	16
<i>Candida utilis</i>	»	»	43, 44
<i>Polysphondylium pallidum</i>	»	КМ-сефадекс	42
Глюкозофосфатизомераза (D-глюкозо-6-фосфат-кетолизомераза, КФ 5.3.1.9) из			
лейкоцитов человека	Глюкозо-6-фосфат	Фосфоцеллюлоза	52
эритроцитов человека	То же	»	2, 33
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) из	Глюкозо-6-фосфат	КМ-целлюлоза	30, 60
печени крысы			

Неорганическая пирофосфатаза из дрожжей	Пирофосфат	Гель гидроокиси алюминия	20
NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа из цитоплазмы печени свиньи	Изоцитрат натрия	КМ-целлюлоза	25
Нуклеаза из куриной поджелудочной железы	Рибонуклеиновая кислота	Фосфорилированная целлюлоза	14
Оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10)	Оротовая кислота	ДЭАЭ-целлюлоза	11
Оротидилатдекарбоксилаза (оротидин-5-фосфатдекарбоксилаза, КФ 4.1.1.23)	Оротовая кислота	ДЭАЭ-целлюлоза	11
Фосфоглицераткиназа из мышц млекопитающих, рыб и кур, печени млекопитающих и дрожжей	Отрицательно заряженные субстраты	Фосфоцеллюлоза	47
Пируваткиназа (АТР-пируватфосфотрансфераза, КФ 2.7.1.40) из печени крысы	Фруктозо-1,6-дифосфат	КМ-целлюлоза	12
Пируваткиназа (АТР-пируватфосфотрансфераза, КФ 2.7.1.40) из печени крысы		Ссфадекс G-200	7
Пируваткиназа (АТР-пируватфосфотрансфераза, КФ 2.7.1.40) из печени крысы	Фосфоенолпируват, фруктозо-1,6-бисфосфат, аденозин-5-дифосфат или пирофосфат	Фосфоцеллюлоза	45
Тирозил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.1.) из пекарских дрожжей	Тирозиновая тРНК	Фосфоцеллюлоза	62

элюирующей среды, для любой системы можно теоретически найти условия образования комплекса фермент — аффинный лиганд. Однако на практике для того, чтобы содержание примесных белков в элюате было минимальным, ионную силу раствора следует поддерживать низкой. Уравнение (7.3) выведено в предположении, что концентрации свободного фермента в уравнениях (7.1) и (7.2) равны. В действительности это является предельным случаем для эффективного элюирования; $[E]$ в уравнении (7.2) не должно превышать $[E]$ в уравнении (7.1), потому что в противном случае фермент оставался бы связанным с полимером. Необходимая для эффективного элюирования концентрация аффинного лиганда может быть определена.

Очистка данного фермента, как правило, определяется специфичностью взаимодействия фермент — аффинный лиганд, как и для других аффинных методов. Если могут образоваться несколько комплексов, например E_1L и E_2L , то трудно определить порядок элюирования ферментов, потому что на практике трудно найти значение K_1 . Если предположить, что K_1^1 — константа ассоциации фермента E_1 с полимером, а K_1^2 — константа ассоциации фермента E_2 с полимером, то при существенных различиях их значений ферменты можно легко разделить простой хроматографией в градиенте соли; при их приблизительном равенстве, оба фермента будут элюироваться одновременно, а если $K_1^2 > K_2$, то E_1 элюируется первым. Так, например, при сорбции на аффинном полимере, несущем NAD^+ в качестве общего лиганда, можно отделить глицеральдегидфосфатдегидрогеназу ($K_{mNAD} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) от лактатдегидрогеназы ($K_{mNAD} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л), применяя в качестве элюента 0,15 мМ NAD^+ [31]. В этом случае K_1^2 равна $1/2 K_2^2$. Подобным образом фруктозо-1,6-дифосфатаза может быть отделена от альдолазы [34] и от пируваткиназы [12], если для элюирования использовать низкую концентрацию фруктозо-1,6-дифосфата, а в качестве полимера — катионообменник.

Типичным примером использования биоспецифического элюирования является выделение аминоксил-тРНК-синтетаз [53]. Эти ферменты взаимодействуют с тремя различно заряженными субстратами — транспортной РНК, АТР и аминокислотами. Аминокислоты не подходят для элюирования синтетаз с анионообменников, потому что при нейтральных рН они существуют в виде цвиттер-ионов и сами адсорбируются. Следовательно, 2-аминоэтанол, например, использовался для элюирования сериновой тРНК-синтетазы, фенилэтиламин — для фенилаланиновой тРНК-синтетазы и тирамин — для тирозиновой тРНК-синтетазы. Эти амины являются конкурентными ингибиторами реакций аминокислотирования соответствующими аминокислотами [54].

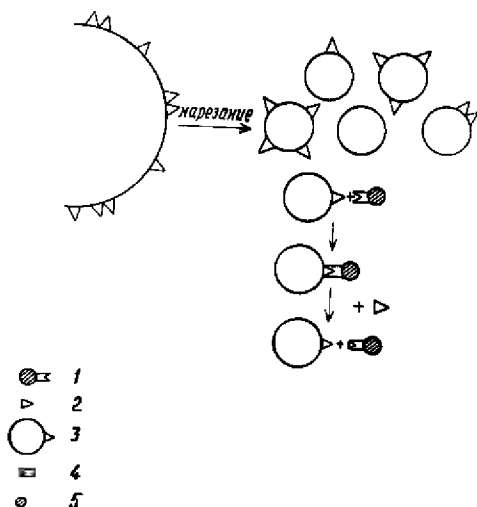
Другие примеры выделения веществ аффинным элюированием даны в табл. 7.3.

7.4. АФФИННАЯ ПЕРТУРБАЦИЯ ПЛОТНОСТИ

Мембраны животных клеток содержат генетически регулируемые специфические системы, которые содержат рецепторы гормонов, токсинов, лекарственных веществ и т. д. В настоящее время уделяется большое внимание исследованиям структуры и функции этих систем. В работах Валлаха и сотр. [57—59] разработан метод, позволяющий фракционировать мембранные фрагменты,

Рис. 7.3. Принципы аффинной пертурбации плотности [58].

Плазматическая мембрана, несущая большое число рецепторов, нарезается на мембранные фрагменты, несущие различное число рецепторов с разным распределением. Фрагменты реагируют с лигандом, связанным с пертурбантом плотности, например, с фазом K29; образуется комплекс мембрана—рецептор—лиганд—фаг с более высокой плотностью, чем плотность самой мембраны, и более низкой плотностью, чем плотность пертурбанта. Добавление низкомолекулярного агента, приводящего к диссоциации, возвращает мембрану и пертурбант плотности к их исходной плотности. 1 — пертурбант плотности, например лиганд — фаг; 2 — аналог рецептора лиганда; 3 — мембранная везикула, несущая рецептор лиганда; 4 — лиганд; 5 — фаг K29.



несущие специфические рецепторы, и этот метод получил название «аффинной пертурбации плотности».

Принцип фракционирования схематически показан на рис. 7.3. Вначале мембраны физически нарезают на крошечные везикулы. Частицы высокой плотности, с которыми ковалентно связан специфический для выделяемого рецептора аффинный лиганд, добавляются к мембранным фрагментам, несущим данный рецептор. Образующийся между добавленным аффинным лигандом и мембранными частицами комплекс быстро отделяется на ультрацентрифуге, поскольку имеет большую плотность. Для того чтобы избежать трудностей, обусловленных небольшими количествами соответствующих рецепторов, мембраны и аффинные лиганды метят разными радиоактивными изотопами. Образование комплексов между мембранными фрагментами и аффинными частицами может быть блокировано или, если необходимо, исключено путем добавления реагентов с более высоким сродством к аффинному лиганду, чем у данного рецептора, или путем введения избытка аналога рецептора, обладающего близким сродством. Частицы, изменяющие плотность, могут быть видны в электрон-

ный микроскоп, который позволяет картировать топологию рецепторов.

В модельной системе в качестве аффинного лиганда использовался гомогенный конканавалин А, меченный ¹²⁵I. Частицы с высокой плотностью, содержащие лиганд, приготовлены ковалентной пришивкой конканавалина А при помощи глутарового альдегида к полифагу К29, представляющему собой стабильный икосаэдр диаметром 450 Å и плотностью 1,495 г/мл. Мембранные фрагменты приготовлены из лимфоцитоплазматических мембран свиньи; они содержали большое количество рецептора конканавалина А. Взаимодействие фрагментов мембраны, несущих рецептор, с пертурбантом обратимо повышало плотность, определяемую в градиенте хлористого цезия, от ~1,18 (для необработанных мембран) до значений, лежащих в широком интервале; максимальная плотность соответствует 1,30—1,40. Это относительно широкое распределение плотности для комплекса между мембраной и конканавалин А — полифагом К29 отражает микрогетерогенность в распределении рецепторных центров. Введение избытка α, α-трегалозы, которая не обладает слишком высоким сродством к конканавалину А ($K=5,38 \cdot 10^3$ л/моль), использовано для диссоциации комплекса конканавалина А с его рецептором. В качестве аффинного лиганда вместо конканавалина А можно использовать антитела, а также гибриды антител, пептидные гормоны и т. д., можно также использовать и другие методы связывания с частицами.

В общем рассмотренный метод может быть применен не только для выделения рецепторных участков гормонов, передатчиков информации или сигналов, лекарственных препаратов, лектинов и специфических антигенов и антител, но также и для картирования топологии мембраны и клетки.

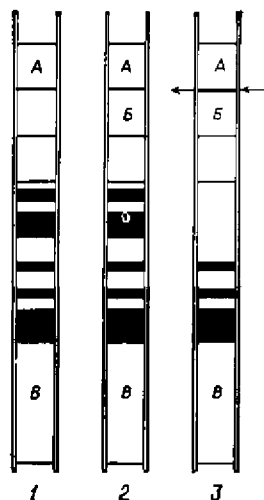
7.5. АФФИННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Аффинный электрофорез в полиакриламидном геле — это метод разделения, использующий преимущества и аффинной хроматографии, и электрофореза в полиакриламидном геле [23, 24]. В микромасштабе он позволяет быстро анализировать смеси белков с избирательным разделением тех компонентов, которые обладают связывающими участками, комплементарными к иммобилизованным специфическим аффинным лигандам. Последние ковалентно связаны с частью матрицы полиакриламидного геля и образуют, таким образом, слой «аффинного геля». Принцип этого метода хорошо иллюстрируется на типичном примере разделения активных белков аффинным электрофорезом, как показано на рис. 7.4. В стеклянных трубках равного диаметра готовят

полиакриламидный гель с тремя слоями: крупнопористый гель (А); аффинный гель, получаемый сополимеризацией алкенил-О-гликозидов с акриламидом с использованием в качестве сшивающего агента N,N'-метиленбисакриламида (Б); мелкопористый гель (В). Стандартный гель, состоящий из двух слоев А и В (трубка 1), всегда используется как контрольный. Трубка 2 содержит аффинный гель из сополимера полиакриламида с О- α -D-галактопиранозой, а трубка 3 — аффинный гель из сополимера полиакриламида

Рис. 7.4. Электрофорез белковой фракции с гемагглютинирующей активностью из гороха [23].

1 — контрольный опыт (стандартный гель); 2 — аффинный гель (Б) образован О- α -D-галактопиранозилполиакриламидом; 3 — аффинный гель (Б) образован О- α -D-маннозилполиакриламидом. А — крупнопористый гель; Б — аффинный гель; В — мелкопористый гель; стрелки указывают границу между крупнопористым и аффинным гелями.



с О- α -D-маннозой. Белковая фракция из гороха (*Pisum sativum* L.), обладающая гемагглютинирующей активностью, содержит пять белковых компонентов, как это следует из картины разделения в контрольной трубке 1. Ни один из этих компонентов не образует комплекса с α -D-галактозилной структурой аффинного геля в трубке 2, о чем свидетельствует идентичность электрофоретических картин разделения в трубках 1 и 2. Однако два из этих компонентов являются фитогемагглютинами, которые взаимодействуют с α -D-маннозилной структурой аффинного геля в трубке 3, и они поэтому задерживаются аффинным гелем в начале трубки 3 в виде узкой полосы (на рис. 7.4 начала аффинных гелей указаны стрелками). Подвижность остальных трех белков в смеси не изменяется, о чем свидетельствует распределение полос белков в мелкопористом геле (В).

Этот метод позволяет как обнаруживать неактивные белковые молекулы, так и, в случае субъединиц и фрагментов, решать, остаются ли их связывающие участки неизменными, а также узнать,

какого типа аффинный сорбент следует выбрать для препаративной аффинной хроматографии. Аналогичный метод независимо разработан Бег-Хансеном [8, 10].

Подобно аффинной хроматографии, аффинный электрофорез в геле можно применять для определения констант диссоциации комплексов белок — лиганд. Принцип метода заключается в изучении зависимости подвижности данного белка от концентрации связанного лиганда в геле. Этот лиганд может быть либо ковалентно связан с гелем, либо только включен в гель (последнее обусловлено высокомолекулярными свойствами лиганда). Впервые такое использование электрофореза описано Такео и Накамурой [50], (хотя в этой работе еще не введен термин «аффинный электрофорез»): константы диссоциации комплексов фосфорилата полисахарида определены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем различные концентрации ковалентно связанного полисахарида. Бег-Хансен [9] применил электрофорез на сефарозе с ковалентно связанным конканавалином А для определения констант диссоциации комплексов конканавалина А с сывороточными гликопротеинами.

Принцип аффинного электрофореза может быть использован не только для определения констант диссоциации комплексов белков со связанными лигандами, но также и для определения констант диссоциации комплексов со свободными лигандами. Подвижность белковой зоны при электрофорезе на аффинном носителе повышается в зависимости от концентрации свободного специфического лиганда. Таким образом были определены константы диссоциации комплексов лектин — сахар [64].

Для приготовления сорбента, содержащего сахар, получают полиакриламидный гель сополимеризацией акриламида, N, N'-метиленабисакриламида и аллилгликозида. Остающийся мономерный аллилгликозид удаляют, гель уравнивают буферным раствором, в котором проводят электрофорез, и вводят снова в трубку. Приготовить растворимый сополимер акриламида с аллилгликозидом технически проще; он может быть лиофильно высушен, причем продукт характеризуется известным содержанием сахара и определенной молекулярной массой. Необходимое количество этого сахаридсодержащего полимера с определенным содержанием связанного сахара добавляют к полимеризационной смеси, обычно используемой при получении полиакриламидного геля. Кроме того, данное количество свободного сахара добавляется также к полимеризационной смеси и гель оставляют полимеризоваться. Таким способом готовят набор трубочек геля с постоянной концентрацией связанного сахара и с возрастающими концентрациями свободного сахара.

Зависимость измеренных подвижностей лектинов в гелях, приготовленных этим способом (с известной концентрацией свобод-

ного сахара), подчиняется соотношению

$$\frac{l}{l_0 - l} = \frac{K_i}{c_i} \left(1 + \frac{c}{K} \right), \quad (7.4)$$

где K_i — константа диссоциации комплекса лектин — связанный сахар; K — константа диссоциации комплекса лектин — свободный сахар; c_i — концентрация связанного сахара; c — концентрация свободного сахара; l — подвижность лектина при данных c_i и c , l_0 — подвижность лектина в отсутствие взаимодействия со связанным сахаром (получается путем аппроксимирования l к высоким концентрациям c ; может быть найдена также при электрофорезе в геле, содержащем инертный полиакриламид).

Это соотношение прямо вытекает из уравнения, выведенного Данном и Чейкеном [13] для определения констант диссоциации с помощью аффинной хроматографии. Таким способом были получены константы диссоциации комплексов конканавалина А и лектина из семян *Lens esculenta* с метил- α -D-маннопиранозидом, метил- α -D-глюкопиранозидом, D-глюкозой и метил- β -D-глюкопиранозидом, а также константы диссоциации комплексов лектинов из семян *Glycine soja*, *Ricinus communis* и *Maclura pomifera* с D-галактозой и лектинов из семян *Ulex europeus* и сыворотки крови угря с L-фукозой. Найденные величины (имеющие порядок 10^{-2} — 10^4) согласуются со значениями, полученными с помощью других методов (равновесным диализом, спектроскопическими методами и т. п.).

Найдено, что почти во всех случаях K_i ниже (в 5—10 раз), чем K , для того же свободного сахара, что, очевидно, является следствием того, что исследованные лектины имеют более одного связывающего центра. Используя аффинный электрофорез, можно определять относительно высокие константы диссоциации (например, для взаимодействия одного из изолектинов сыворотки крови угря с L-фукозой найдена константа диссоциации $K = 2 \cdot 10^{-2}$ моль/л). Теоретически можно изучать также взаимодействия, по крайней мере в десятки раз более слабые.

Аффинный электрофорез дает следующие преимущества при определении констант диссоциации:

а) небольшое количества образца, который может даже быть весьма неомогенным;

б) одновременное определение K_i и K для всех электрофоретически отличающихся компонентов, взаимодействующих с изучаемым лигандом, присутствующим в образце (например, для изолектинов);

в) для всех c_i и c полосы резкие, и их положение можно хорошо определить (в аффинной хроматографии имеет место значительное уширение пиков при низких c); наиболее узкая полоса

наблюдается при $c=0$, т. е. тогда, когда в аффинной хроматографии анализ положения пиков вообще невозможен;

г) быстрота метода, простота лабораторного оборудования одновременный анализ большого количества образцов;

д) широкий диапазон K и K_d ; возможность определения высоких K (однако определить K для заряженных электрофоретически подвижных лигандов этим методом нельзя).

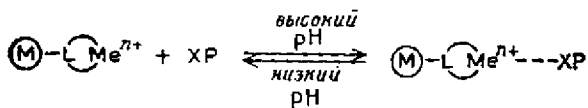
Метод может быть также полезен для изучения взаимодействий других белков (например, антител и ферментов) со специфическими лигандами.

7.6. МЕТАЛЛОХЕЛАТНАЯ АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Сродство белков к ионам тяжелых металлов может быть положено в основу способа очистки и анализа этих белков [39]. Способы основаны на образовании устойчивых комплексов гистидина и цистеина с ионами цинка или меди в нейтральных водных растворах. В качестве избирательных сорбентов (преимущественно для гистидин- и цистеинсодержащих пептидов и белков) можно использовать гидрофильные гели с прочно фиксированными ионами Zn^{2+} или Cu^{2+} . Наряду с упомянутыми ионами координационные соединения с гистидином и цистеином образуют также кадмий, ртуть, кобальт и никель.

Порат и сотр. [39] приготовили хелатообразующие сорбенты для белков и пептидов из производных агарозы. Поскольку перечисленные ионы металлов относятся к переходным элементам, их аффинность зависит от pH. При pH 6—8 сорбция белков избирательна для гистидина и, возможно, также для цистеина. При щелочных pH имеет место координационное связывание аминокислот, что приводит к более эффективной, но в то же время менее избирательной сорбции.

Для облегчения регенерации хроматографического сорбента необходимо, чтобы ионы металла имели более высокое сродство к гелю, чем к веществам, подлежащим выделению. Это иллюстрируется с помощью следующей схемы:



где M — матрица геля, L — хелатообразующий лиганд, Me^{n+} — ион металла, а X — аффинный заместитель в белке или в пептиде XP .

На рис. 7.5 показано разделение белков сыворотки крови металлохелатной хроматографией. В качестве гель-образующей мат-

рицы М использовалась оксиранактивированная агароза с присоединенными бискарбоксиметиламиногруппами (хелатообразующие лиганды L). Матрица содержала связанные ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} . В пиках хроматографических фракций определен следующий состав белков: I — альбумин; II — альбумин, γ -глобулины, преаль-

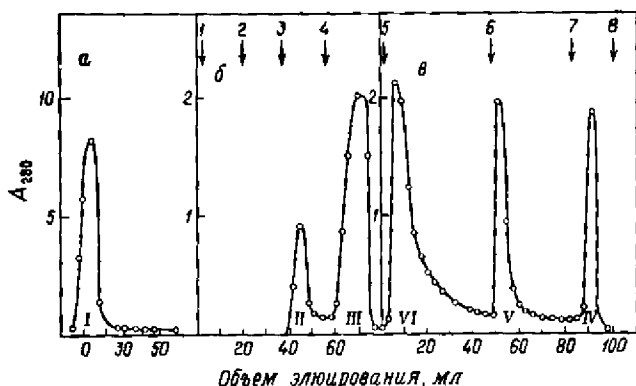


Рис. 7.5. Хроматограмма, полученная элюированием колонок со связанными Zn^{2+} и Cu^{2+} [39].

а — обе колонки промывались 60 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (рН 8), содержащего 0,15 моль/л NaCl; б — колонка с Cu^{2+} . Адсорбированный материал удалялся из каждой колонки раздельно при элюировании согласно следующей схеме: 1 — 18 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 6,5); 2 — 20 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,8 моль/л NaCl (рН 6,5); 3 — 17 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,8 моль/л NaCl (рН 4,5); 4 — 25 мл 0,05 М ЭДТА, содержащего 0,5 М NaCl (рН 7,0); а — колонка с Zn^{2+} ; б — 47 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (рН 6,5); 6 — 38 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,8 моль/л NaCl (рН 6,5); 7 — 12 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера, содержащего 0,8 моль/л NaCl (рН 4,5); 8 — 10 мл 0,5 М ЭДТА, содержащего 0,5 моль/л NaCl (рН 7,0).

бумин, следовые количества α_1 -антитрипсина; III — альбумин, трансферин, гаптоглобины, β -липопротеин, следовые количества γ -глобулинов; IV — трансферин, α_1 -антитрипсин, кислый гликопротеин, γ -глобулины, церулоплазмин; V — трансферин, следовые количества гемоглобина, следовые количества γ -глобулина; VI — α_2 -макроглобулин, следовые количества гемоглобина. В ходе хроматографии ни один из компонентов не денатурировал. Металлохелатный гель сохранял свою адсорбционную способность даже в 1 М хлористом натрии, который исключал возможность обычной ионной адсорбции, имеющей место на этом геле.

На основании ориентировочных опытов установлено, что из аминокислот, присутствующих в белке, наиболее сильно сорбируются гистидин и цистеин. При рН 8—9 адсорбируются также другие аминокислоты, но при понижении рН они десорбируются значительно раньше, чем гистидин. Следовательно, можно предположить, что хроматографическое поведение белков преимущест-

венно обусловлено количеством и плотностью экспонированных имидазольных и тиольных групп на поверхности молекул. Могут также играть роль индолные группы.

Адсорбционная емкость хелатов по белкам сыворотки крови понижается в следующем ряду металлов: $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Mn}$. Очень эффективны хелаты меди, в то время как марганецхелатный гель имеет ничтожную адсорбционную емкость. Значительная адсорбционная емкость и разделяющая способность некоторых гелей делают их пригодными при разделениях веществ в крупном масштабе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ashani Y., Wilson I. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 317—322 (1972).
2. Barnes I. D., Kuehn G. D., Atkinson D. E., *Biochemistry*, **10**, 3939—3944 (1971).
3. Bertrand O., Kahn A., Cottreau D., Boivin P., *Biochimie*, **58**, 261—267 (1976).
4. Bigelis R., Umbarger H. E., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4315—4321 (1975).
5. Blumberg P. M., Strominger J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **69**, 3751—3755 (1972).
6. Blumberg P. M., Strominger J. L., *Methods Enzymol.*, **34**, 401—405 (1974).
7. Blume K. G., Hoffbauer R. W., Busch D., Arnold H., Löhr G. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 364—372 (1971).
8. Bøg-Hansen T. C., *Anal. Biochem.*, **56**, 480—488 (1973).
9. Bøg-Hansen T. C., *Abstr.*, 10th. Int. Congr. Biochem., Hamburg, 1976, p. 188.
10. Bøg-Hansen T. C., Bjerrum O. J., Ramlau J., *Scand. J. Immunol.*, **4**, Suppl. 2, 141—147 (1975).
11. Brown G. K., Fox R. M., O'Sullivan W. J., *J. Biol. Chem.*, **250**, 7352—7358 (1975).
12. Carminatti H., Rozengurt E., Jiménez de Asua L., *FEBS Lett.*, **4**, 307—310 (1969).
13. Dunn B. M., Chaiken I. M., *Biochemistry*, **14**, 2343—2349 (1975).
14. Eley J., *Biochemistry*, **8**, 1502—1506 (1969).
15. Er-el Z., Zaidenzaig Y., Shaltiel S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 383—390 (1972).
16. Fernando J., Enser M., Pontremoli S., Horecker B. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 599—606 (1968).
17. Gillam I., Blew D., Warrington R. C., Von Tiegerstrom M., Tener G. M., *Biochemistry*, **7**, 3459—3468 (1968).
18. Gillam I., Millward S., Blew D., Von Tiegerstrom M., Wimmer E., Tener G. M., *Biochemistry*, **6**, 3043—3056 (1967).
19. Green A. A., *J. Biol. Chem.*, **93**, 495—516 (1931).
20. Heppel L. H., *Methods Enzymol.*, **2**, 570—576 (1955).
21. Hjertén S., *J. Chromatogr.*, **87**, 325—331 (1973).
22. Hofstee B. H. J., *Anal. Biochem.*, **52**, 430—448 (1973).
23. Horejší V., Kocourek J., *Methods Enzymol.*, **34**, 178—181 (1974).
24. Horejší V., Kocourek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 338—343 (1974).
25. Illingworth J. A., Tipton K. F., *Biochem. J.*, **118**, 253—258 (1970).
26. Jakoby W. B., Wilchek M., *Methods Enzymol.*, **34**, 1—810 (1974).
27. Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G., Jr., *Biochemistry*, **14**, 754—760 (1975).
28. Jost R., Miron T., Wilchek M., *Biochem. Biophys. Acta*, **362**, 75—82 (1974).
29. Lowe C. R., Dean P. D. G., *Affinity Chromatography*, Wiley, New York, London, 1974, p. 272.

30. Matsuda T., Yugari Y., J. Biochem., **61**, 535—540 (1967).
31. Mosbach K., Guilford H., Ohlsson R., Scott M., Biochem. J., **127**, 12P—13P (1972).
32. Nishikawa A. H., Ballon P., Anal. Biochem., **68**, 274—280 (1975).
33. Phillips T. L., Talent J. M., Gracy R. W., Biochim. Biophys. Acta, **429**, 624—628 (1976).
34. Pogell B. M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **7**, 225—230 (1962).
35. Pogell B. M., Methods Enzymol., **9**, 9—15 (1966).
36. Pogell B. M., Sarngedharan M. G., Methods Enzymol., **22**, 379—385 (1971).
37. Pontremoli S., Methods Enzymol., **9**, 625—631 (1966).
38. Pontremoli S., Traniello S., Luppis B., Wood W. A., J. Biol. Chem., **240**, 3459—3463 (1965).
39. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., Nature (London), **258**, 598—599 (1975).
40. Porath J., Sundberg L., Fornstedt N., Olsson I., Nature (London), **245**, 465—466 (1973).
41. Raibaud O., Högborg-Raibaud A., Goldberg M. E., FEBS Lett., **50**, 130—134 (1975).
42. Rosen O. M., Arch. Biochem. Biophys., **114**, 31—37 (1966).
43. Rosen O. M., Rosen S. M., Horecker B. L., Arch. Biochem. Biophys., **112**, 411—420 (1965).
44. Rosen O. M., Rosen S. M., Horecker B. L., Methods Enzymol., **9**, 632—636 (1966).
45. Sarngedharan M. G., Watanabe A., Pogell B. M., J. Biol. Chem., **245**, 1926—1929 (1970).
46. Schulz J., Wilhelm G., Lorenz G., Hofmann E., Acta Biol. Med. Ger., **34**, 1321—1332 (1975).
47. Scopes R. K., Fijis T., Proc. Austr. Biochem. Soc., **8**, 17 (1975).
48. Shaltiel S., Methods Enzymol., **34**, 126—140 (1974).
49. Shaltiel S., Er-el Z., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **70**, 778—781 (1973).
50. Takeo K., Nakamura S., Arch. Biochem. Biophys., **153**, 1—7, (1972).
51. Thayer P. S., J. Bacteriol., **66**, 656—663 (1953).
52. Tilley B. E., Gracy R. W., Welch S. G., J. Biol. Chem., **249**, 4571—4579 (1974).
53. Von der Haar F., Eur. J. Biochem., **34**, 84—90 (1973).
54. Von der Haar F., Methods Enzymol., **34**, 163—171 (1974).
55. Von der Haar F., Biochem. Soc. Trans., **2**, 1297—1298 (1974).
56. Voss H. F., Ashani Y., Wilson I. B., Methods Enzymol., **34**, 581—591 (1974).
57. Wallach D. F. H., Methods Enzymol., **34**, 171—177 (1974).
58. Wallach D. F. H., Kranz B., Ferber E., Fischer H., FEBS Lett., **21**, 29—33 (1972).
59. Wallach D. F. H., Lin P. S., Biochim. Biophys. Acta, **300**, 211—254 (1973).
60. Watanabe A., Taketa K., J. Biochem., **72**, 1277—1280 (1972).
61. Weiss H., Bücher T., Eur. J. Biochem., **17**, 561—567 (1970).
62. Yamada A., J. Biochem. (Tokyo), **74**, 187—190 (1973).
63. Yon R. J., Biochem. J., **126**, 765—767 (1972).
64. Horejší V., Tichá M., Kocourek J., Biochim. Biophys. Acta, **499**, 290—308 (1977).

Нерастворимые носители и наиболее распространенные методы иммобилизации лиганда

Для развития аффинной хроматографии и иммобилизации ферментов наиболее важны поиск и разработка новых нерастворимых носителей. Исследования в этом направлении необходимы для введения в практику методов, до сих пор применявшихся главным образом в лабораториях. Поскольку до сих пор не создан носитель, который удовлетворял бы полностью всем предъявляемым требованиям, необходимо очень тщательно относиться к вопросам выбора носителя и метода присоединения к нему лиганда, принимая во внимание возможность его практического применения, а также и экономические соображения. Учитывая это, можно понять быстрые темпы развития работ, посвященных носителям. Все большее число различных типов носителей становится коммерчески доступным; в табл. 8.3 и 8.4 перечислены гели, поставляемые фирмами Pharmacia и Bio-Rad Labs*. Выбор нерастворимых носителей и методов присоединения всегда зависит от того, какие гели лучше отвечают предъявляемым к ним требованиям, при этом учитывается и цена этих носителей. Для многих исследователей еще долго будут доступными лишь простейшие носители, которые перед присоединением лиганда должны быть активированы. Поэтому после вводного раздела, в котором излагаются требования, предъявляемые к идеальному носителю, следует раздел, посвященный наиболее распространенным носителям, методам их активации и присоединения к ним лигандов. Поскольку несомненно, что в настоящее время наиболее часто используемым носителем является агароза (см. табл. 11.1), разд. 8.2.4, посвященный ей, немного более детализирован, чем другие разделы, описывающие целлюлозу, диальдегидкрахмал — метилنديанилин, декстрановые гели, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиакриламидный и оксикалкиметакрилатные гели и стекло. В специальных разделах рассматриваются вопросы, касающиеся пространственных групп (разд. 8.3), блокирующихся неактивных групп (разд. 8.4) и отщеплению присоеди-

* Упомянуты только фирмы, известные автору, поэтому перечень носителей неизбежно неполный; ни в коем случае не следует рассматривать этот перечень как рекомендацию каких-либо отдельных фирм или продуктов.

ненных аффинных лигандов (разд. 8.5). В заключительном разделе (разд. 8.6) суммируются свойства индивидуальных носителей и особенности методов.

8.1. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ХАРАКТЕРИСТИКАМ НОСИТЕЛЕЙ

Для успешного применения в аффинной хроматографии и для иммобилизации ферментов идеальная матрица должна обладать следующими свойствами [53]:

- 1) нерастворимостью;
- 2) достаточной проницаемостью и большой удельной поверхностью;
- 3) высокой жесткостью и подходящей формой частиц;
- 4) нулевой адсорбционной емкостью;
- 5) химической реактивностью, позволяющей вводить аффинные лиганды или ферменты;
- 6) химической стабильностью в условиях, требуемых для присоединения, адсорбции, десорбции и регенерации;
- 7) устойчивостью к действию микробов и ферментов;
- 8) гидрофильным характером.

Полная нерастворимость существенна не только для предотвращения потерь аффинного сорбента, но главным образом для предотвращения загрязнений изолируемого вещества растворившимся носителем.

Достаточная проницаемость нерастворимого носителя необходима для того, чтобы не затруднялось образование комплексов макромолекул с комплементарными аффинными лигандами; этот вопрос детально уже обсуждался в разд. 5.1. Высокая пористость нерастворимого носителя довольно существенна для выделения веществ с относительно слабым сродством к связанному аффинному лиганду (константа диссоциации $\geq 10^{-5}$). Концентрация присоединенного аффинного лиганда, легко доступного для выделяемого вещества, в этом случае должна быть очень высока, для того чтобы достичь сильного взаимодействия, которое физически задерживает выделяемые вещества, мигрирующие по колонке.

В табл. 8.1 приведены количества химотрипсина и глицина, связанных с 1 мл оксиалкилметакрилатных гелей, которые различались размерами пор, молекулярной массой исключения и удельной поверхностью [80]. Очевидно, что количество связанного химотрипсина непосредственно зависит от удельной поверхности, максимальной для сферона 300 и сферона 500. Количество связанного глицина указывает на сравнительно небольшие различия в числе реакционноспособных групп для разных носителей этого типа. В табл. 8.1 приведена также относительная протеолитическая активность.

Таблица 8.1

Количества химотрипсина и глицина, связанных с оксиалкилметакрилатными гелями (сферонами) в зависимости от их удельной поверхности

Гель	Молекулярная масса исключения	Удельная поверхность, м ² /мл	Количество связанного глицина, мг/мл	Количество связанного химотрипсина, мг/мл	Относительная [протеолитическая активность, %]
Сферон 10 ⁵	10 ⁸	0,96	0,5	0,73	
Сферон 10 ³	10 ⁶	5,9	3,1	7,8	44
Сферон 700	700 000	3,6	2,8	6,7	49
Сферон 500	500 000	23	2,6	17,1	37
Сферон 300	300 000	19,5	3,15	17,7	44
Сферон 200	200 000	0,6	2,3	6,9	53
Сферон 100	100 000	0,2	2,6	2,6	38

Требования жесткости и подходящей формы частиц связаны с проблемой скорости потока. Для того чтобы аффинная хроматография протекала без осложнений, элюент должен проникать через колонку с носителем с достаточной скоростью, даже когда носитель содержит связанный аффинный лиганд. Размер частиц геля должен находиться в интервале <200 и >5 мкм.

Сорбент должен проявлять минимальную неспецифическую сорбцию. При приготовлении нерастворимого аффинного лиганда важно, чтобы он прикреплялся к носителю только ковалентной связью, а молекулы аффинного лиганда, не связанные ковалентно, должны быть отмыты. Это трудно осуществить, если носитель сильно адсорбирует молекулы аффинного лиганда. Подобным образом, если выделяют вещества, образующие специфический и обратимый комплекс со связанным аффинным лигандом, важно, насколько это возможно, чтобы только эти вещества задерживались на колонке с нерастворимым аффинным сорбентом и только в виде специфического комплекса со связанным аффинным лигандом. Это является одной из причин, почему носители, которые содержат ионогенную группу, такие, как сополимер этилена с малеиновым ангидридом, у которого остается ряд свободных карбоксильных групп после присоединения аффинного лиганда, никогда не будут столь широко применяться в аффинной хроматографии, как нейтральная агароза.

Носители должны обладать достаточным числом химических групп, которые могут быть активированы или модифицированы таким образом, чтобы приобрести способность связывать аффинные лиганды. Емкость специфического сорбента, приготовленного присоединением аффинного лиганда к нерастворимому носителю, зависит от числа этих групп. Активация или модификация должны происходить в условиях, которые не изменяют структуру но-

сителя. Не менее важны химическая и механическая устойчивость носителя в условиях присоединения аффинного лиганда, а также при различных величинах pH, температурах и ионных силах, в условиях возможного присутствия денатурирующих агентов, необходимых для хорошей сорбции и элюирования выделяемого вещества, и т. д. Возможность повторного использования спенифического сорбента зависит от такой стабильности.

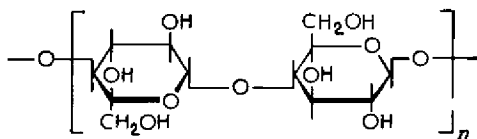
Следующее требование связано с предыдущими: специфические сорбенты не должны атаковаться микроорганизмами и ферментами. Этому требованию лучше удовлетворяют неорганические носители, такие, как стекло, или синтетические полимеры, такие, как полиакриламид или оксиалкилметакрилатные гели.

Гидрофильные свойства нерастворимых носителей желательны не только потому, что необходимо свести к минимуму неспецифическую сорбцию и инактивацию, но также и потому, что на носителях с гидрофобными свойствами может уменьшаться стабильность некоторых связанных ферментов в результате денатурации, аналогичной той, которая вызывается органическими растворителями.

8.2. ОБЗОР НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ НЕРАСТВОРИМЫХ НОСИТЕЛЕЙ И МЕТОДОВ ПРИСОЕДИНЕНИЯ К НИМ

8.2.1. Целлюлоза и ее производные

Целлюлоза представляет собой линейный полимер β -1,4-связанных звеньев D-глюкозы со случайными 1,6-связями:



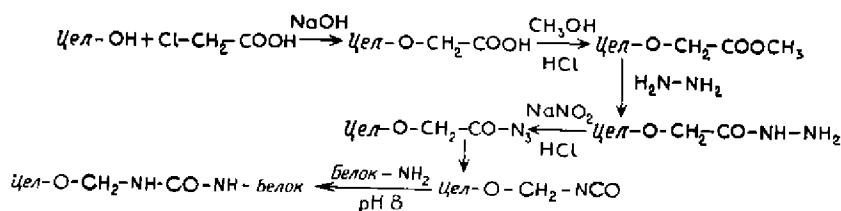
Выпускаемые промышленностью препараты на основе целлюлозы обычно сшиты бифункциональными реагентами, такими, как 1-хлор-2,3-эпоксипропан, и химически весьма устойчивы. Гликозидные связи подвержены кислотному гидролизу, и в экстремальных условиях наблюдается почти количественное расщепление до свободной кристаллической D-глюкозы. При взаимодействии с окислительными агентами, такими, как периодат натрия, образуются альдегидные и карбоксильные группы. Целлюлоза подвержена атаке целлюлаз, например микробных.

Целлюлоза и ее производные производятся рядом фирм. Наряду с фирмами Whatman (Англия) и Schleicher & Schüll (Швей-

цария) фирмой Serva (ФРГ) предлагается ряд производных целлюлозы: бромацетилцеллюлоза (ВА-целлюлоза), *п*-аминобензоилцеллюлоза (РАВ-целлюлоза), бензоил-ДЭАЭ-целлюлоза (ВД-целлюлоза) и бензоилнафтоил-ДЭАЭ-целлюлоза (ВНД-целлюлоза). Фирма Bio-Rad Labs. (США) поставляет *п*-аминобензоилцеллюлозу (Cellex РАВ) и аминокэтилцеллюлозу (Cellex АЕ). Фирма Miles Labs. (Англия) производит гидразид КМ-целлюлозы (энзайт-СМС-гидразид), бромацетилцеллюлозу (ВАС) и *м*-аминобензилоксиметилцеллюлозу (АВМС). Кроме носителей для связывания аффинных лигандов эти фирмы производят также готовые аффинные сорбенты, как это уже отмечалось в разд. 6.11.

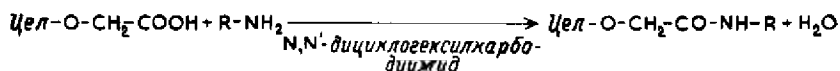
Обзор связанных аффинных лигандов, преимущественно белковой природы, на целлюлозе и ее производных сделан Сильманом и Качальским [67], обзор связывания ферментов — Круком и сотр. [11], а связывания нуклеотидов, полинуклеотидов и нуклеиновых кислот — Гилагом [22]. В этих обзорах упомянуто много различных методов связывания. Поскольку в настоящее время целлюлоза находит ограниченное использование в аффинной хроматографии, здесь кратко отмечают только некоторые из методов связывания.

Наиболее распространен метод связывания веществ со свободной аминогруппой на целлюлозе (Цел) с использованием азидного метода Курциуса. Этот метод впервые применен Мичелом и Эверсом [47]; до настоящего времени он наиболее широко используется в модификации Хорнби и др. [29]

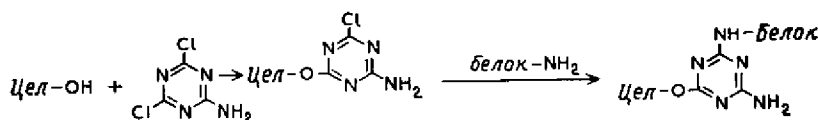


Получив азид карбоксиметилцеллюлозы, можно превратить его (перегруппировка Курциуса) в изоцианат, который затем связать с аминогруппой аффинного лиганда.

Аффинные лиганды с основными аминогруппами могут быть, кроме того, присоединены к карбоксильным группам карбоксиметилцеллюлозы в присутствии карбодимида [85]



Кей и Лилли [33] разработали триазиновый метод связывания белков. 2-Амино-4,6-дихлор-*симм*-триазин связывается с гидроксильной группой целлюлозы и далее реагирует с аминогруппой белка



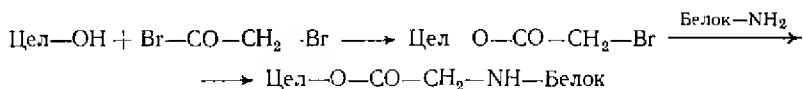
2-Амино-4,6-дихлор-*симм*-триазин приготовлен исходя из циануровой кислоты и затем введен в реакцию с различными полисахаридными носителями, такими, как целлюлоза, ДЭАЭ-целлюлоза, КМ-целлюлоза, а также сефадекс и сефароза. Ниже приведена методика проведения реакции.

Готовят два раствора. *Раствор А*. 10 г 2-амино-4,6-дихлор-*симм*-триазина растворяют в 250 мл ацетона при 50°C и к полученному раствору добавляют 250 мл воды при той же температуре. *Раствор Б*. К 15%-ному (вес: объем) раствору карбоната натрия добавляют 0,6-кратный объем 1 М НСl. К 100 мл раствора А прибавляют целлюлозу (20 г) или КМ-целлюлозу и смесь перемешивают при 50°C в течение 5 мин. Затем добавляют 40 мл раствора Б и продолжают перемешивание при 50°C еще 5 мин. рН суспензии быстро снижают до ≤ 7 концентрированной соляной кислоты. После фильтрования модифицированную целлюлозу промывают водно-ацетоновой смесью и, наконец, 0,1 М фосфатным буфером (рН 6,7), который использовался и для ее хранения.

Связывание химогтрисина осуществляют из 1,5%-ного раствора в 0,5 М боратном буфере (рН 8,75) при 23°C; через 4,5 ч получают продукт, содержащий 19 мг фермента в 1 г препарата с сохранением 70% ферментативной активности.

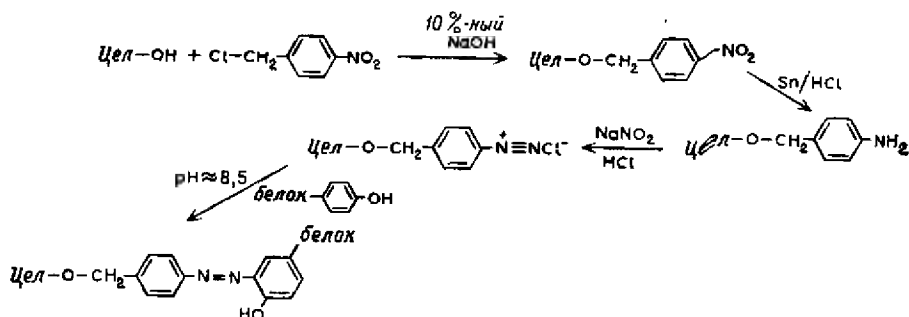
Моригава и др. [42] применили дихлор-*симм*-триазиновые смолы в качестве носителей для иммобилизованных ферментов.

Ягендорф и др. [31] разработали метод связывания белков, основанный на ацилировании гидроксильных групп в целлюлозе бромацетилбромидом с последующим алкилированием аминогрупп белка



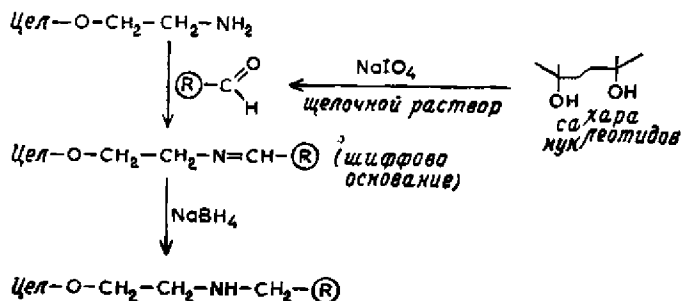
Описаны [64] приготовление и свойства аминоксидлазы, ковалентно присоединенной к галогенацетилцеллюлозам. Связывание белка из 0,6%-ного раствора аминоксидлазы в 0,2 М фосфатном буфере (рН 8,5) в течение 24 ч при 7°C дало продукт, который содержал 56 мг белка-фермента на 1 г препарата с сохранением 30% активности.

Впервые присоединение аффинного лиганда к целлюлозе было осуществлено с помощью азосочетания [7]



Аффинные лиганды связываются своими ароматическими остатками (в случае белков главным образом тирозином и гистидином), а также неспецифически, и более медленно своими аминогруппами [26, 73].

Нуклеиновые кислоты привязываются к аминцеллюлозе в большинстве случаев с помощью периодатного окисления [22, 41]



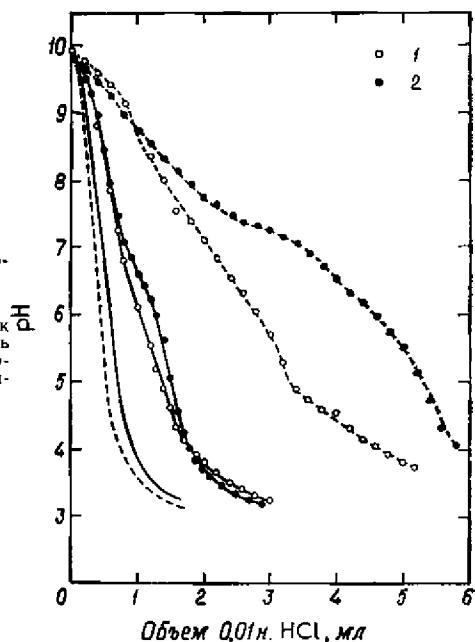
Хотя целлюлоза применялась как носитель преимущественно в начальный период развития аффинной хроматографии, она все еще используется и в настоящее время (табл. 11.1).

В работе Лоу и др. [42] сопоставлены свойства сорбентов на основе целлюлозы и сефарозы, для чего использовались экспериментальные кривые титрования 6-аминогексил- NAD^+ -сефарозы, немодифицированной сефарозы, 6-аминогексанонил-сефарозы и соответствующих производных целлюлозы (рис. 8.1). Очевидно образование ионизирующих групп после активация бромцианом; это было также показано в случае целлюлозы, когда для реакции присоединения использовали дициклогексилкарбодимид [38]. Отклонение, наблюдаемое для сефарозы, существенно меньше,

чем для целлюлозы; поэтому целлюлозу считают неподходящей для приготовления аффинных сорбентов. Преимущественно неспецифическая сорбция нуклеотидов на целлюлозе с повышенным содержанием примесей лигнина отмечалось в разд. 6.8 (табл. 6.3) [16].

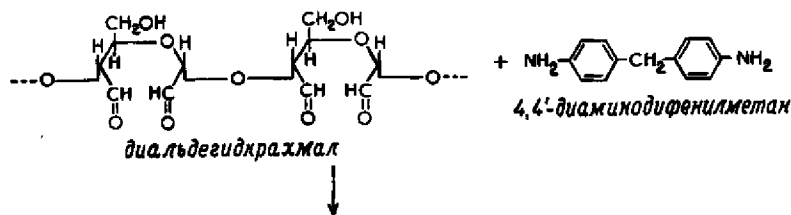
Рис. 8.1. Кривые титрования 6-аминокапроила-NAD⁺-полимеров [42].

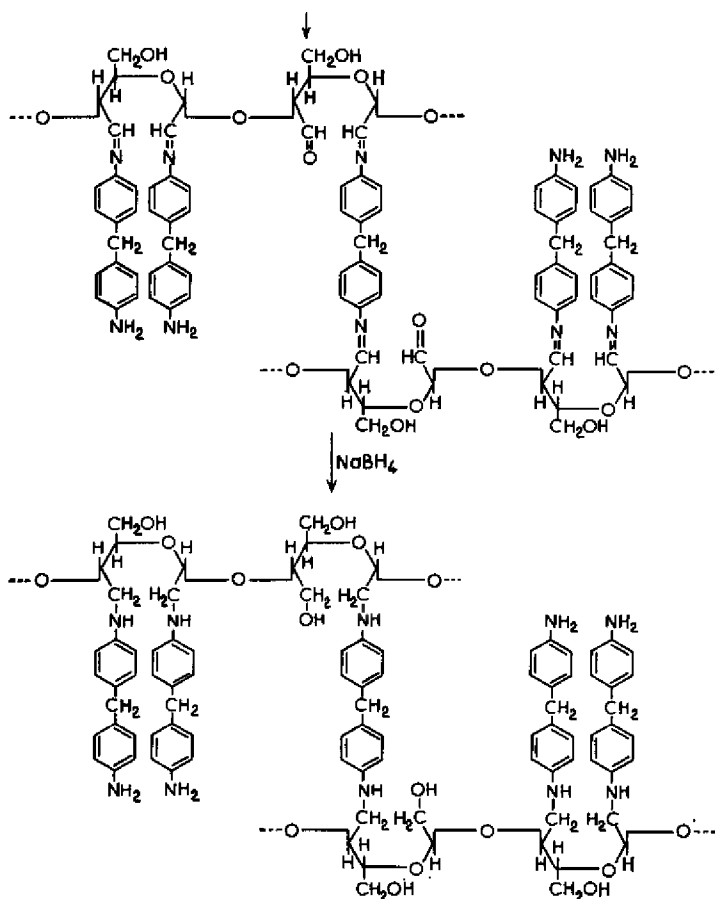
Сплошные линии относятся к сефарозе 4В и ее производным, пунктирные к целлюлозе и ее производным; 1 — носитель с присоединенной 6-аминогексановой кислотой; 2 — носитель с присоединенной 6-аминокапроила-NAD⁺.



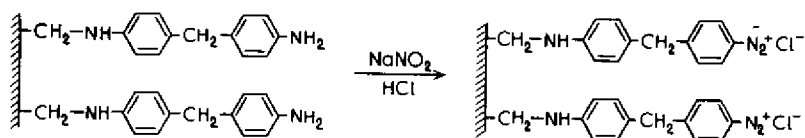
8.2.2. Диальдегидкрахмал — метилنديанилин (К—МДА)

Носитель К—МДА получается из диальдегидкрахмала (продукта периодатного окисления крахмала) путем конденсации с 4,4'-диаминодифенилметаном (метилنديанилином) и последующим восстановлением образующихся шиффовых оснований [23]





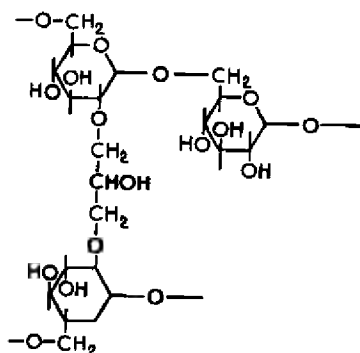
Для связывания с белками носитель сначала превращается в соли диазония



Емкость по диазотированию носителя К—МДА составляет 0,24—0,26 мэкв./г, а максимальная емкость по связыванию белков — 80—100 мг/г. Носитель К—МДА используется преимущественно для связывания ферментов. Известен, например, К—МДА—меркурипапаин [94]. Дiallyдегидкрахмал выпускается фирмой Miles Chemical Co (США) под названием Sumstar 190.

8.2.3. Декстрановые гели

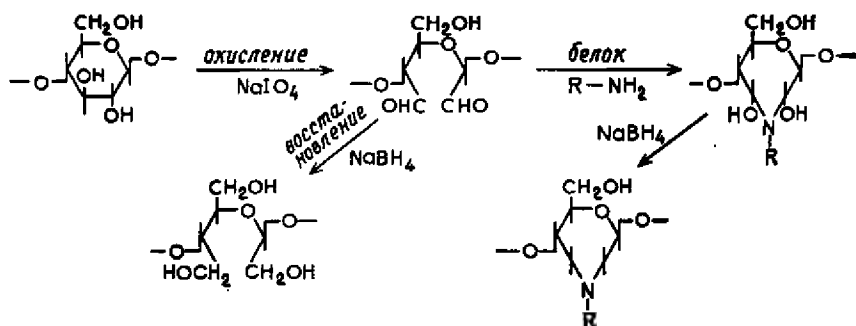
Декстран — это полисахарид с разветвленными цепями из остатков глюкозы, продуцируемый в растворах, содержащих сахар, различными штаммами *Leuconostoc mesenteroides*. Растворимый декстран, приготовленный дробным осаждением спиртом частично гидролизованного неочищенного декстрана, содержит $>90\%$ α -1,6-глюкозидных связей и разветвляется, образуя 1,2-, 1,3- и 1,4-глюкозидные связи. Сшитый 1-хлор-2,3-эпоксипропаном в щелочном растворе, декстран представляет собой трехмерный гель, структурный фрагмент которого приведен ниже



Основной производитель декстрановых гелей (сефадексов) фирма Pharmacia (Швеция). Гели очень устойчивы к химическому воздействию; например, выдерживание в течение 2 месяцев в 0,25 М NaOH при 60°C не оказывает на них никакого влияния. При низких pH глюкозидная связь чувствительна к гидролизу; несмотря на это, декстрановые носители устойчивы при 6-месячном выдерживании в 0,02 М HCl или 1–2-часовом — в 0,1 М HCl или в 88%-ной муравьиной кислотой [41]. Под действием окислительных агентов образуются альдегидные и карбоксильные группы. При изучении термической устойчивости гелей обнаружено, что в растворе они могут выдерживать 40-минутное нагревание в автоклаве при 110°C, а в сухом виде — нагревание при 120°C. Высушивание и набухание в воде обратимы. Гели до определенной степени набухают даже в спирте, этиленгликоле, формамиде, N,N-диметилформамиде и диметилсульфоксиде.

Присоединение аффинных лигандов к декстрановым гелям может быть осуществлено с помощью ряда методов, описанных для целлюлозы, а также агарозы (см. ниже), а именно: связывание после активации бромцианом, триазиновый метод, связывание с использованием эпоксидов или бифункциональных производных или связывание через ацилазидные промежуточные соединения.

Простой метод привязки белков к нерастворимым полисахаридам описан Сандерсоном и Уилсоном [63]. Ниже приведена соответствующая схема последовательных реакций

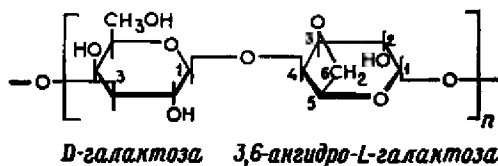


Полисахариды «активировались» окислением путем одночасовой обработки 0,01—0,5 М периодатом натрия. Образующийся альдегид реагирует с белком. 10 мг окисленных полисахаридов, промытых водой с помощью центрифугирования, суспендировались в 1 мл забуференного фосфатным буфером (pH 8) физиологического раствора, содержащего 10 мг бычьего сывороточного альбумина, и непрерывно перемешивались в течение 20 ч. Последующее восстановление борогидридом натрия (свежеприготовленным 1%-ным раствором) привело к стабилизации связей между белком и полисахаридом и к восстановлению остающихся альдегидных групп.

Использование декстрановых гелей частично ограничено из-за их относительно низкой пористости (разд. 5.1). Примеры их использования для аффинной хроматографии даны в табл. 11.1. Они широко применяются непосредственно (без какой-либо модификации) в качестве специфических сорбентов для выделения ряда лектинов.

8.2.4. Агароза и ее производные

Агароза — линейный полисахарид, построенный из чередующихся остатков D-галактозы и звеньев 3,6-ангидро-L-галактозы



является в настоящее время наиболее распространенным носителем для аффинной хроматографии. Как показали Куатреказас и Анфинсен [13], агароза удовлетворяет почти всем требованиям идеального носителя.

Главными производителями агарозы являются фирма Pharmacia (Швеция), выпускающая ее под названием сефароза, и Bio-Rad Labs. (США) — под названием биогель А.

Сефароза — это гель агарозы со сферическими частицами; в продажу поступает в виде суспензии в воде (в набухшем состоянии), содержащей 0,02% азида натрия в качестве бактериостатического агента. Первыми в продаже появились следующие три типа сефароз: 1) сефароза 6В — гель, соответствующий ~6%-ной агарозе; набухшие гранулы размером 40—210 мкм; применяется для фракционирования веществ с молекулярной массой 10^5 — 10^6 ; 2) сефароза 4В, соответствующая ~4%-ной агарозе; набухшие гранулы размером 40—190 мкм; для фракционирования веществ с молекулярной массой $3 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^6$; 3) сефароза 2В, соответствующая 2%-ной агарозе; размер частиц 60—250 мкм; для фракционирования веществ с молекулярной массой $2 \cdot 10^6$ — $25 \cdot 10^6$.

Из табл. 11.1 видно, что наиболее часто используется сефароза 4В; сравнение некоторых свойств сефароз 2В, 4В и 6В дано в табл. 8.4. В 1975 г. введена в практику сефароза CL (2В, 4В и 6В), приготовленная из соответствующих сефароз путем поперечного сшивания 2,3-дибромпропанолом в сильнощелочной среде с последующим обессериванием щелочным гидролизом в восстанавливающих условиях.

Известно несколько типов биогелей А:

Содержание агарозы, % Молекулярная масса исключения

Биогель А-0,5m	10	$0,5 \cdot 10^6$
Биогель А-1,5m	8	$1,5 \cdot 10^6$
Биогель А-5m	6	$5 \cdot 10^6$
Биогель А-15m	4	$15 \cdot 10^6$
Биогель А-50m	2	$50 \cdot 10^6$
Биогель А-150m	1	$150 \cdot 10^6$

Все эти гели производятся с частицами трех размеров, а именно 149—290, 74—149 и 38—74 мкм. Они поставляются полностью гидратированными в суспензии, содержащей 0,02% азида натрия, 0,001 М трис и 0,001 М ЭДТА.

Гели агарозы [SAG(агогель)-10, 8, 6, 4 и 2] с пределами исключения молекулярной массы $25 \cdot 10^4$ — $15 \cdot 10^7$ поставляются также фирмами Seravac Labs. (Англия) и Mann Labs. (США). В качестве растворителей рекомендуются разбавленные водные растворы солей.

Производные сефарозы, готовые для прямого присоединения аффинных лигандов, перечислены в табл. 8.2. Из новых носителей предложена активированная бромцианом сефароза 6МВ (макрогранулированная сефароза 6В; размер частиц 200—300 мкм); она предназначена для аффинной хроматографии клеток. Активированная тиол-сефароза 4В (смешанный дисульфид, образованный

Таблица 8.2

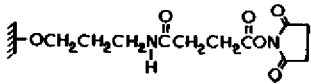
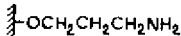
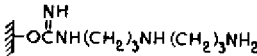
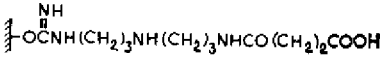
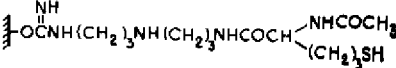
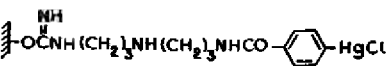
**Избирательное связывание лигандов с носителями для получения
аффинных сорбентов**

Тип лиганда	Функциональная группа	Производное сефарозы	Условия присоединения	Примечания
Углеводы и другие гидроксилсодержащие соединения	—OH	Эпоксипроактивированная сефароза 6В	16 ч, 20—45 °С, рН 9—13	Можно работать в органических растворителях (например, в 100%-ном формамиде)
Аминокислоты и пептиды	—NH ₂	Активированная CN-сефароза 4В	1 ч, температура комн., рН 5—9	Прямое присоединение аминокислот и пептидов.
	—NH	Эпоксипроактивированная сефароза 6В	16 ч, 20—45 °С, рН 9—13	Другие функциональные группы (например, CO ₂ H) не требуют защиты
Белки	—NH ₂	Бромцианактивированная сефароза 4В и 6МВ	2 ч, температура комн. или 16 ч при 4 °С и рН 8—10	Наиболее хороший метод присоединения белков
Аминокислоты, кетокислоты и карбоксикислоты	—CO ₂ H	АН-сефароза 4В	Карбодимид, 16 ч, температура комн., рН 4,5—6,0	Можно работать в органических растворителях (например, в 50%-ном диметилсульфоксиде)
Тиолсодержащие соединения	—SH	Активированная тиол-сефароза 4В, эпоксипроактивированная сефароза 6В	Очень разнообразные условия	Реакция присоединения легко обратима

2,2'-дипиридилдисульфидом и глутатионом, присоединенным к активированной бромцианом сефарозе 4В) предназначена для ковалентной хроматографии (разд. 7.2). Производные агарозы (биогель А-15m, размер частиц 74—149 мкм), модифицированные для использования в аффинной хроматографии, выпускаются фирмой Bio-Rad Labs. под названием аффигели (табл. 8.3).

О стабильности агарозы известно, что она устойчива в области рН 4—9; не рекомендуются температуры ниже 0 °С и выше 40 °С. Сефароза устойчива к высоким концентрациям солей, мочевины (7 моль/л) и гуанидинхлориду (6 моль/л) [12]. Она не

Свойства аффигель-носителей

Носитель	Длина «ножки», Å	Формула ^а	Концевая реактивная группа	Связывание лиганда	
				группа связывания	тип связи
Аффигель 10	10 ^б		Активированная карбоксильная в виде N-оксисукцинимидного эфира	Первичная алифатическая или ароматическая аминная	Пептидная
Аффигель 101	6 ^б		Аминная	Свободная карбоксильная	Пептидная
Аффигель 102	10 ^в		»	Галогеналкильная	C—N-ковалентная
Аффигель 201	10 ^б		Карбоксильная	Свободная первичная алифатическая или ароматическая аминная	Пептидная
Аффигель 202	15 ^в		»	Тиольная	Дисульфидная
Аффигель 401	15 ^в		Сульфгидрильная	Свободная тиокарбоксильная	Дисульфидная тиосложноэфирная
Аффигель 501	15 ^в		Органомеркури(II)хлорид	Активная сульфгидрильная	Меркаптидная

^а  Матрица агарозы (биогель А-15 m, 100—200 меш).

^б «Ножка» привязана к телу агарозы эфирной связью.

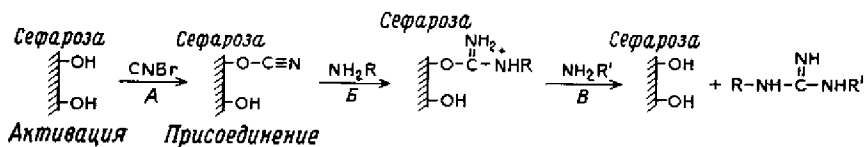
^в «Ножка» привязана к телу агарозы бромциановым методом.

меняется даже при кратковременном (2—3-часовом) выдерживании при комнатной температуре в 0,1 М едком натре и 1 М соляной кислоте. Для аффинной хроматографии веществ, слабо растворимых в воде, можно использовать также растворы в 50%-ном диметилформамиде или в 50%-ном этиленгликоле. Лиофильное высушивание можно осуществлять только после добавления в водную суспензию сорбента защитных веществ, например декстрана, глюкозы и сывороточного альбумина.

Стабильность матрицы агарозы можно значительно повысить путем сшивания эпихлоргидрином [34, 56], 2,3-дибромпропанолом [34, 36] или дивинилсульфоном [34, 58] перед активацией бромцианом. Устойчивость в водной среде как в кислой, так и в щелочной областях (pH 3—14) растет с увеличением числа сшивок. Возможность использования хаотропных солей, главным образом для элюирования антител, обсуждается в разд. 10.2. Благодаря сшиванию гели приобретают большую устойчивость в органических растворителях, таких, как спирт, диметилформамид, тетрагидрофуран, ацетон, диметилсульфоксид, хлороформ, хлористый метилен, дихлорэтан и дихлорэтан — пиридин (1 : 1).

Связывание аффинных лигандов с агарозой, активированной бромцианом

Наиболее широко используемый метод связывания аффинного лиганда с сефарозой разработан Поратом, Аксеном и Эрнбаком [2, 55]; он основан на активации носителя бромцианом. Аффинные лиганды связываются посредством первичных алифатических или ароматических аминогрупп в непротонированной форме. Аксен и Эрнбак [1] предположили, что при этом образуются три различные структуры, а именно N-замещенные карбаматы, N-замещенные имидокарбонаты и N-замещенные изомочевины. N-замещенная мочевина, как предположил Свенсон [72] на основании работ по изоэлектрофокусированию, является преобладающей формой. Вильчек и др. [93] представили различные химические доказательства того, что N-замещенные изомочевины действительно являются главными продуктами реакции между аминами и сефарозой, активированной бромцианом, как это показано на следующей схеме:



Присоединение аминов к сефарозе, активированной бромцианом, приводит, таким образом, к замещенным изомочевинам. Так,

в результате реакции в нейтральной и щелочной средах образуются группы, способные протонироваться и функционирующие как ионообменники. Дальнейшее добавление аминов к N-замещенным изомочевинам приводит к образованию N₁, N₂-дизамещенных гуанидинов. В комбинации с гидрофобными цепями алкиламинов образующиеся положительные заряды действуют как детергенты. В результате этого возрастает неспецифическая сорбция, что может рассматриваться как обратимая денатурация белков «детергеноподобными» производными агарозы и как следствие в некоторых случаях, например при элюировании пенициллиназы с этилсефарозы 1 М раствором хлорида натрия, происходит инактивация фермента [90].

Образование катионных групп носителя на стадии B может быть предотвращено использованием гидразидов вместо алифатических аминов. Образующиеся производные имеют рК 4,2, и, следовательно, они не заряжены при нейтральных рН [37, 50, 91, 92]. Преимущества использования в качестве пространственных групп гидразидов детально обсуждаются в разд. 8.3.

Изучение реакции N-замещенной изомочевины, конъюгированной сефарозой, с аминами и бычьим сывороточным альбумином [93] помогло понять расхождение между опубликованными данными о стабильности конъюгатов. Соединения, содержащие нуклеофилы, например амины или белки, расщепляют связи изомочевины согласно приведенной выше схеме. Если расщепление связей наблюдается в отсутствие таких соединений, то это происходит, вероятно всего, благодаря освобождению адсорбированных молекул аффинного лиганда, которые были плохо отмыты. Количество освобождающегося лиганда в результате очень медленного гидролиза изомочевины обычно очень мало и не мешает нормальному процессу аффинной хроматографии. Как показано в разд. 8.5, отщепление аффинного лиганда от специфического сорбента существенно главным образом в системах с высоким сродством или при выделении небольших количеств вещества. Шнапп и Шалитин [65] предотвращали отщепление аффинных лигандов под действием нуклеофилов после присоединения к сефарозе, активированной бромцианом, путем замены связи изомочевины более устойчивой связью гуанидина, для чего бромцианом активировали носитель, содержащий аминокгруппы.

Степень активации агарозы, оцениваемая данными о емкости по связыванию небольших пептидов [1], прямо пропорциональна рН. Активация проводится при рН 11. Методика активации сефарозы бромцианом детально описана ниже [2, 12, 55].

Активация агарозы бромцианом при контроле рН с помощью рН-метра

Отмытая и декантированная сефароза суспендируется в дистиллированной воде (1:1). Работу проводят под тягой. Электроды рН-метра погружают в суспензию, в которую при постоянном перемешивании прибавляют небольшим пор-

циями бромциан (50—300 мг на 1 мл набухшей сефарозы). рН суспензии поддерживают ~ 11 , добавляя раствор едкого натра. Концентрацию последнего выбирают в зависимости от количества сефарозы и бромциана. Куатреказас [12] рекомендует использовать для 5—10 мл набухшей сефарозы и 1—3 г добавляемого бромциана 2 М NaOH, а для 100—300 мл набухшей сефарозы и 20—30 г бромциана — 8 М NaOH. Температура не должна превышать 20 °С, если необходимо охлаждение, добавляют лед. Реакция заканчивается за 8—12 мин. После быстрого перенесения суспензии в воронку Бюхнера при постоянном отсасывании активированную сефарозу промывают охлажденным буферным раствором того же состава, который используется при последующей привязке аффинного лиганда. Объем буферного раствора для промывания должен быть в 10—15 раз больше объема раствора, в котором проводилась активация сефарозы. Промывая сефароза как можно быстрее суспендируется в равном объеме раствора аффинного лиганда. Согласно Куатреказасу [12], промывка, добавление раствора аффинного лиганда и смешивание не должны занимать более 90 с. Даже при низкой температуре активированная сефароза нестабильна.

Активированная бромцианом сефароза 4В поступает в продажу в виде лиофильно высушенного продукта, содержащего декстран и лактозу, которые перед использованием следует отмыть. Ниже приводится методика для привязки аффинного лиганда к активированной бромцианом сефарозе, предлагаемая фирмой Pharmacia.

Требуемое количество геля замачивают для набухания в 10^{-3} М соляной кислоте; 10^{-3} М соляную кислоту используют также для промывки геля в течение 15 мин. 1 г лиофильно высушенного геля набухает до объема $\sim 3,5$ мл. Гель рекомендуется промывать в несколько приемов, используя на 1 г сухого геля 200 мл раствора. Сразу же после промывки добавляют раствор аффинного лиганда, который необходимо привязать к сефарозе. Оптимальные условия для связывания аффинного лиганда (рН, состав буфера и температура) зависят до определенной степени от характера лиганда. Как правило, реакция связывания наиболее эффективна при рН 8—10, но можно использовать и более низкие значения рН, если этого требует природа связываемого лиганда. Аффинный лиганд присоединится в достаточных количествах даже и при этих рН, если увеличить количество бромциана при активации и количество лиганда при связывании. Аффинный лиганд, в особенности белкового характера, растворяют в буфере с высокой ионной силой (около 0,5) для предотвращения неспецифической адсорбции. Высокая ионная сила облегчает затем последующую промывку. Можно использовать карбонатный и боратный буферы с добавками хлорида натрия.

Количество связанного аффинного лиганда зависит от содержания его в реакционной смеси и объема геля, рН реакции, природы присоединяемого лиганда (числа реакционных групп и т. п.), а также от времени реакции и температуры. Например, при присоединении химотрипсина к 2 мл активированной бромцианом сефарозы при рН 8 из 10 мг присутствующего белка присоединяется только 5 мг, из 20 мг — ~ 8 мг, а из 30 мг — ~ 10 мг. При комнатной температуре (20—25 °С) присоединение обычно заканчивается за 2 ч, в то время как при более низких температурах рекомендуется оставлять реакционную смесь на ночь. Реакционную смесь следует перемешивать, однако не рекомендуется использовать магнитную мешалку, так как это может привести к механической деструкции геля.

Когда присоединение заканчивается, гель с привязанным аффинным лигандом переносят на пористый стеклянный фильтр и промывают тем же самым буферным раствором, в котором проводилось присоединение. Для удаления оставшихся активных групп фирма Pharmacia рекомендует блокировать их обработкой 1 М 2-аминоэтанолом при рН 8 в течение 2 ч. Продукт должен быть затем

промыт 4—5 раз другими буферными растворами с высоким и низким рН [например, ацетатным (0,1 моль/л, рН 4) и боратным (0,1 моль/л, рН 8,5) буферами, содержащими 1 моль/л хлорида натрия]. Как уже указывалось, все вещества, связанные не ковалентно, должны быть удалены в ходе промывок.

Активация агарозы бромцианом в концентрированном фосфатном буфере [54]

Для активации больших количеств агарозы и для активации мембран из агарозы или тонких слоев агарозы, покрывающих стеклянные шарики, Порат и др. [54] разработали очень простой и воспроизводимый метод активации в щелочном фосфатном растворе очень высокой буферной емкости; при этом отпадает необходимость контроля рН и интенсивного перемешивания. Найдены условия для высокой, средней и низкой степеней активации, которые выбираются, исходя из природы связываемого аффинного лиганда. Кроме того для высокой степени активирования гелей, были выбраны условия как для гелей с низким содержанием агарозы ($p=1-4\%$), так и с высоким ($p=4-8\%$) содержанием. Методики даны для гелей с разным содержанием ($p, \%$) агарозы в набухшем геле.

Метод А. Высокоактивированные гели агарозы ($p=1-4\%$)

Набухший гель (10 г $p \%$ -ной агарозы) суспендируют в 2,5 p мл холодного ($5-10^\circ\text{C}$) 5 М К-фосфатного буфера (3,33 моль K_2PO_4 + 1,67 моль K_2HPO_4 в 1 л раствора). Суспензию разбавляют дистиллированной водой до 20 мл и прибавляют небольшими порциями в течение 2 мин 0,1 p мл водного раствора бромциана (100 мг/мл). Раствор в течение 10 мин (включая время, необходимое для прибавления бромциана) осторожно перемешивают при $5-10^\circ\text{C}$. Продукт активации промывают на стеклянном фильтре холодной водой до нейтральной реакции.

Метод Б. Высокоактивированные гели агарозы ($p=4-8\%$)

Гель агарозы промывают 2 М фосфатным буфером и отфильтровывают при отстаивании. 10 г $p \%$ -ной агарозы суспендируют в 2,5 p мл холодного фосфатного буфера и активируют, как в методе А, с 1,0 p мл водного раствора бромциана.

Метод В. Среднеактивированные гели агарозы ($p=1-8\%$)

Методика идентична описанной для метода А; для приготовления суспензии используют 0,5 p мл буферного раствора и прибавляют 0,2 p мл бромциана.

Метод Г. Слабоактивированные гели агарозы ($p=1-8\%$)

Методика аналогична описанной для метода А; для приготовления суспензии используют 0,12 p мл буферного раствора и прибавляют 0,05 мл бромциана.

Активированные продукты быстро промывают 0,25 М карбонатом натрия (рН 9), в котором проводили связывание химотрипсина, по методике, подобной той, которая используется для промывания продажной активированной сепарозы.

Упрощенный метод активации агарозы бромцианом [44, 45]

Бромциан растворяют в ацетонитриле (2 г/мл, т.е. 19 моль/л). Раствор устойчив при -20°C и может храниться при этой температуре. Равные объемы 50%-ной (по объему) водной суспензии агарозы и растворы 2 М карбоната натрия смешивают и охлаждают во льду. Затем прибавляют ацетонитрильный раствор бромциана (0,2 г бромциана на 1 мл набухшей агарозы) и смесь 1—2 мин перемешивают. Активированный гель затем промывают и добавляют к раствору связываемого вещества (например, в 0,2 М бикарбонате натрия, pH 9,5). Преимуществом этого метода является его простота и существенное сокращение неприятных и опасных манипуляций с бромцианом во время взвешивания.

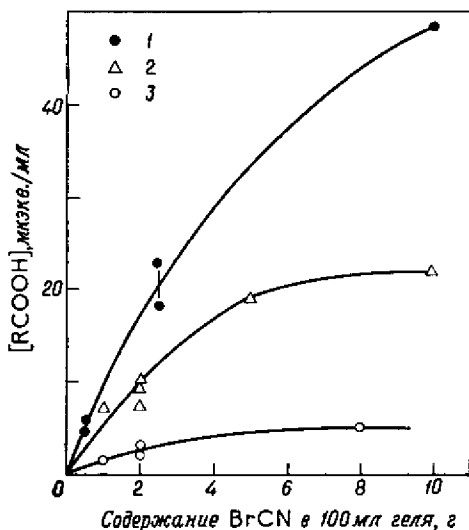


Рис. 8.2. Влияние бромциана на присоединение ϵ -аминокапроновой кислоты [49].

6%-ная агароза (сефароза 6В) (1), 4%-ная агароза (сефароза 4В) (2) и 2%-ная агароза (бюгель А-50м) (3) при $4-10^{\circ}\text{C}$ обрабатывались бромцианом. Для присоединения использовали сравнимые количества ϵ -аминокапроновой кислоты (0,018 моль на 100 мл активированного геля). Карбоксильные группы в геле определяли титрованием.

Высокая стабильность бромциана в N-метил-2-пирролидоне использована Нишикавой и Бэйлоном [49] при изучении влияния количества бромциана на активацию агарозы. На рис. 8.2 показано влияние бромциана на связывание 6-аминогексановой кислоты 6, 4 и 2%-ной агарозой. Бромциан прибавлялся в виде 16%-ного (по объему) водного раствора в N-метил-2-пирролидоне.

Конечное количество связанного аффинного лиганда можно регулировать, изменяя количество бромциана, вводимого при активации. Необходимо, чтобы используемые препараты бромциана были бесцветными, а кристаллы практически не плавилась. Желтоватоокрашенные препараты плохо реагируют.

Изучение влияния концентрации ϵ -аминокапроновой кислоты на ее связывание активированной бромцианом сефарозой показало, что высокая концентрация аффинного лиганда при коротком времени инкубации дает лучшие результаты, чем низкая концентрация при продолжительной инкубации.

В табл. 8.4 приведены количества аффинного лиганда, связанного с 2, 4 и 6%-ной агарозой, а также рассчитанные значения ожидаемой плотности гидроксильных групп в различных гелях агарозы. Выход в реакции химического присоединения для

Таблица 8.4

Свойства гелей агарозы

Гель	Содержание агарозы, %	Рассчитанные значения плотности гидроксильных групп, моль/л [49]	Молекулярная масса ($\times 10^6$) исключения [49]	Предельное химическое связывание (присоединение 1,6-диаминогексана), мкг/мл [49]	Содержание эластазы в реакционной смеси, мг на 1500 мг сухого геля [70]	Содержание эластазы срезанной, мг на 1 г сухого конъюгата [70]	Выход фермента (относительно исходного количества фермента), % [70]	Максимальная скорость потока до и после присоединения л-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозида, мл·мин ⁻¹ ·см ⁻² [61]	
								до	после
Сефароза 2В	2	—	—	—	50	12,5	37,5	0,95	1,1
Биогель А-50m	2	0,29	50	5	—	—	—	—	—
Сефароза 4В	4	0,58	15	20	50	25	80	1,8	2,2
Сефароза 6В	6	0,88	5	60	50	33	99	3,6	3,8

всех типов гелей составляет, по-видимому, около 1—2% от числа гидроксильных групп, которые могли бы участвовать в реакции. В табл. 8.4 приведены также данные, полученные Санбергом и Кристиансеном [70] для связывания эластазы активированными бромцианом сефарозами 2В, 4В и 6В и определенные Робинсоном и др. [61] максимальные скорости потока через колонки с индивидуальными типами сефарозы до и после присоединения *n*-аминофенил- β -D-тиогаляктопиранозиды.

Из работы Нишикавы и Бэйлона [49] следует важный вывод, касающийся этого метода и заключающийся в необходимости поддержания температуры между 4 и 10°C во время реакции активации бромцианом, в то время как реакция связывания аффинного лиганда может проводиться при комнатной температуре. В ряде гелей ϵ -аминокапроновую кислоту связывали в различных условиях и определяли ее количество титрованием или по содержанию азота. Во всех случаях при действии бромциана включалось больше азота, чем можно было бы ожидать из содержания связанной ϵ -аминокапроновой кислоты, определенной титрованием; включение превышало расчет в отношении от 3:1 до 9:1. Превышение включения азота против расчетного возрастало с увеличением температуры активации (при 2°C оно составляло 3,3 раза, при 4°C — 4,9 раза, а при 20°C — 8,3 раза). Поскольку при 2°C активация протекает очень медленно, такие условия нельзя использовать на практике. При 10°C наилучшим образом сочетаются достаточно высокая скорость активации и минимальное число побочных процессов. Побочные реакции, сопровождаемые повышением содержания азота в препаратах иммобилизованных лигандов, являются одним из источников катионных групп, которые приводят к неспецифической сорбции. Этот вопрос детально обсуждается в разд. 10.3. Лоу и Дин [41] отмечали, что активированные гели содержат хотя и в небольших, но существенных количествах бром, что можно объяснить присутствием в препаратах бромциана трибромтриазина, который может участвовать в реакции связывания.

Другим источником неспецифической сорбции агарозой является сера [35], которая может быть почти полностью удалена щелочной десульфуризацией в присутствии борогидрида натрия с последующим восстановлением алюмогидридом лития в диоксане. Влияние уменьшения содержания серы в различных препаратах агарозы на адсорбционную емкость по цитохрому с описано Поратом и др. [56].

Присоединение аффинных лигандов к агарозе с помощью бифункциональных оксиранов [71]

Бисоксираны (например, диглицидильный эфир бутандиола-1,4) были использованы для введения в агарозу реакционноспособ-

на, присоединенного к эпоксиактивированной сефарозе 6В, при 70°C и pH 3, 7, 11 и 13.

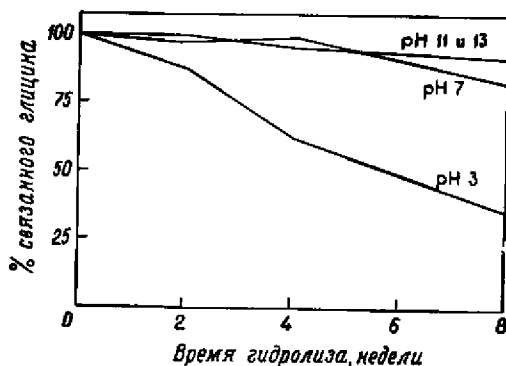


Рис. 8.3. Устойчивость при 70°C глициллейцина, присоединенного к эпоксиактивированной сефарозе 6В [96].

Обратимая ковалентная иммобилизация ферментов с помощью тиол-дисульфидного обмена [6]

Карлсон и др. [8] использовали эпоксиактивированную агарозу в качестве основы для приготовления меркаптооксипропилового эфира агарозы, которую они применили для ковалентной иммобилизации α -амилазы и химотрипсина с помощью тиол-дисульфидного обмена. Методика включает две стадии: а) тиолирование ферментов метил-3-меркаптопропиоимидатом и б) связывание тиолированных ферментов со смешанными дисульфидными производными агарозы, полученными при взаимодействии меркаптооксипропилового эфира агарозы с 2,2'-дипиридилдисульфидом. Полученные препараты иммобилизованных ферментов обладали высокой активностью. Иммобилизованная α -амилаза была применена для непрерывного гидролиза крахмала. Когда препарат терял свою ферментативную активность, неактивный белок удаляли восстановлением дисульфидных связей и гель повторно использовали для связывания свежей активной тиолированной α -амилазы.

Обогащение фермента тиольными группами. 30 мг фермента растворяют в 5 мл 0,1 М бикарбоната натрия (pH 8,2). Раствор деаэрируют в атмосфере азота в течение 15 мин; добавляют 0,1—2 мг метил-3-меркаптопропиоимидата. Тиолирование проводят при комнатной температуре в токе азота в течение 60 мин. Избыток имидата удаляют гель-фильтрацией через сефадекс G-25, в качестве элюента используют 0,1 М бикарбонат натрия. Для предотвращения окисления тиолированных ферментов в раствор сразу же после гель-фильтрации вводят литиотреитол (до концентрации 1 ммоль/л).

Активирование тиол-сефарозы по Броклехурсту и др. [6]. Эпоксиактивированную агарозу (50 г) промывают на стеклянном фильтре 0,5 М фосфатным бу-

фером (4,1 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + 2,8$ г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 100 мл дистиллированной воды, pH 6,3). Гель отсасывают на воронке для удаления буфера, находящегося в порах геля, и суспендируют в том же буфере; конечный объем суспензии 100 мл. После прибавления 2 М тиосульфата натрия (50 мл) реакционную смесь застряхивают 6 ч при комнатной температуре. Гель отмывают от тиосульфата натрия дистиллированной водой. Тиосульфатный эфир геля (50 г) суспендируют в растворе 0,1 М бикарбоната натрия (содержащего 1 ммоль/л ЭДТА); общий объем суспензии 100 мл. К суспензии прибавляют дитиотреитол (60 мг), растворенный в 4 мл 1 М ЭДТА. При комнатной температуре реакция продолжается 30 мин. Гель промывают на стеклянном фильтре 0,1 М бикарбонатом натрия (содержащим 1 моль/л хлорида натрия и 1 ммоль/л ЭДТА) и, наконец, 1 М ЭДТА. Отмытый гель быстро добавляют к 200 мл 1,5 мМ 2,2'-дипиридилдисульфида (в 0,1 М бикарбонате натрия). Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Продукт промывают 0,1 М бикарбонатом натрия, 1 М хлоридом натрия, а затем 1 М ЭДТА. Степень замещения рассчитывают по данным определения азота по Кьельдалю. Продукт — активированная тиол-агароза — при хранении устойчив.

Связывание тиолированного фермента. 1—20 мг тиолированного фермента в 10 мл 0,1 М бикарбоната натрия смешивают с 3,0 мл седиментированной активированной тиол-агарозы (предварительно промытой 0,1 М бикарбонатом натрия); реакцию проводят при 23°C в течение 24 ч при постоянном перемешивании. Конъюгат промывают на воронке со стеклянным фильтром 100 мл 0,1 М бикарбоната натрия, переносят в колонку, через которую были пропущены (со скоростью потока 10 мл/ч) следующие растворы: 1) 0,1 М бикарбонат натрия, содержащий 0,2 моль/л хлорида натрия (24 ч); 2) 0,1 М ацетат натрия (pH 5,4), содержащий 0,2 моль/л хлорида натрия (24 ч); 3) 0,2 М хлорид натрия (24 ч).

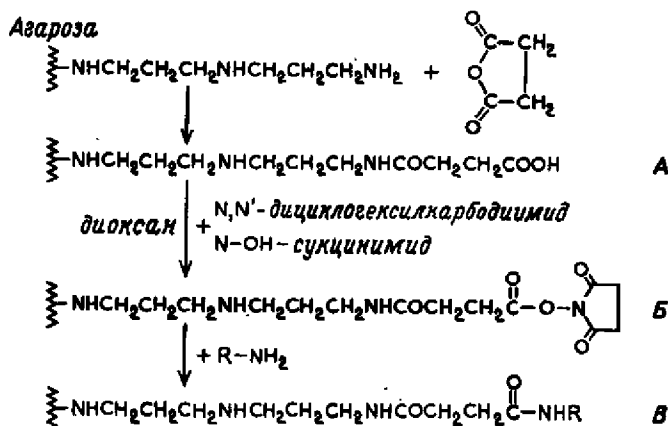
Инактивированный фермент удаляют с носителя в колонке (объем колонок 0,5 мл) промыванием (скорость потока 20 мл/ч) 50 мл 20 мМ дитиотреитола (в 0,1 М бикарбонате натрия). Восстановленный носитель промывают 150 мл 1 М хлорида натрия и активируют пропусканьем 100 мл 1,5 мМ 2,2'-дипиридилдисульфида (в 0,1 М бикарбонате натрия). Активированный тиолсодержащий гель промывают 100 мл 1 М хлорида натрия и 100 мл 0,1 М бикарбоната натрия и повторно используют для иммобилизации новой тиольной системы.

Наряду с описанными выше для связывания аффинных лигандов с агарозой используется также триазиновый метод. Первоначально он был разработан Кеем и Лилли [33] для связывания аффинных лигандов с целлюлозой (разд. 8.2.1) с помощью 2-амино-4,6-дихлор-симм-триазина.

Присоединение аффинных лигандов с помощью N-оксисукцинимидных эфиров агарозы

Куатреказас и Парих [15] описали приготовление N-оксисукцинимидных эфиров сукцинированных аминокальких производных агарозы. Эти активные эфирные производные агарозы при хранении в диоксане устойчивы в течение нескольких месяцев. Они очень быстро образуют стабильные амидные связи (при 4°C) с непротонированными формами первичных алифатических или ароматических аминогрупп при pH 6—9. Из функциональных групп исследованных аминокислот только сульфгидрильные эф-

фективно конкурируют с аминогруппами в реакции связывания. Реакция протекает по следующей схеме:

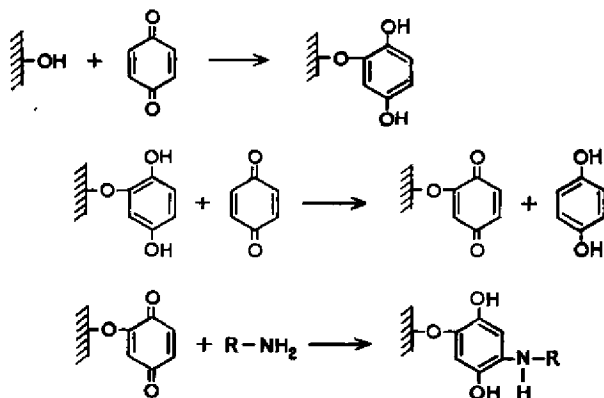


Диаминодипропиламиноагароза обрабатывается янтарным ангидридом в насыщенном Na-боратном буфере для получения соответствующего сукцинилированного производного А. Последний вводят в реакцию с N, N'-дициклогексилкарбодиимидом и N-оксисукцинимидом в диоксане для получения активного эфира агарозы Б. После удаления дициклогексилмочевины и непрореагировавших реагентов (промывание диоксаном и метанолом) активный эфир агарозы вводят в реакцию в водной среде с лигандами или белками для получения устойчивого производного с амидной связью с носителем В.

Используя этерификацию карбоксильных групп СН-сефарозы 4В (т. е. сефарозы, к которой после активации бромцианом привязана ε-аминокапроновая кислота) N-оксисукцинимидом фирма Pharmacia (Швеция) производит «активированную СН-сефарозу 4В». Для связывания на этом производном рекомендуется область рН 5—10; оптимальное значение рН равно 8. Преимущество низких рН состоит в уменьшении гидролиза эфиров, однако при этом скорость реакции снижается. Для связывания не могут использоваться буферные растворы, содержащие аминокислоты (трис-буфер или глициновый). Производные агарозы, содержащие N-оксисукцинимидный эфир, выпускаются также фирмой Bio-Rad Labs. (США) под названием аффигель 10.

Ковалентное присоединение белков к полисахаридным носителям, в том числе к агарозе, с помощью бензохинона [5]

Механизм активации и связывания по этому методу, вероятно, можно описать схемой

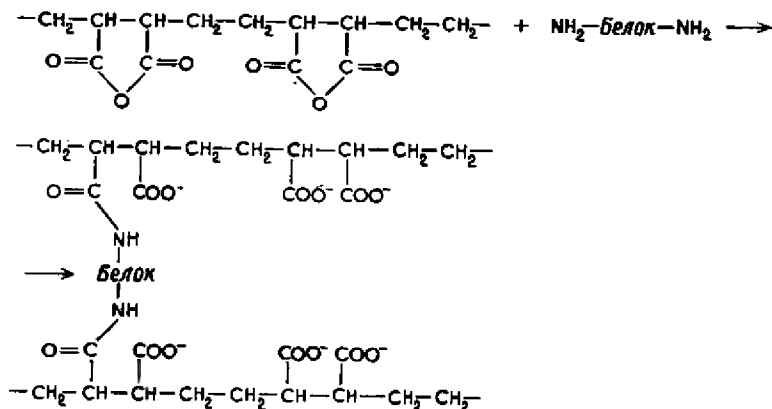


Связывание белков на активированных гелях происходит при щелочных pH. Сывороточный альбумин наиболее полно связывается при pH 8; количество связанного химотрипсина увеличивается с ростом pH; при pH 10 связывание максимально.

Аффинные лиганды, которые содержат свободные карбоксильные группы, могут быть связаны с аминоэтилагарозой при помощи водорастворимых карбодимидов. Этот метод детально обсуждается в разд. 8.3.

8.2.5. Сополимер этилена и малеинового ангидрида

Иммобилизация аффинных лигандов на сополимере этилена и малеинового ангидрида (ЭМА) рассмотрена в обзоре Гольдштейна [23]. Метод связывания ферментов на таком сорбенте разработан Левиным и др. [40]. Белок присоединяется к ангидридным группам полимера своими аминогруппами

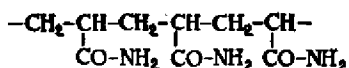


Когда аффинный лиганд привязан к матрице (например, в 0,2 М К-фосфатном буфере, рН 7,5), карбоксильные группы освобождаются (либо в результате связывания с белком, либо из-за гидролиза в водной среде), и они придают сорбенту полианионные свойства.

Сополимер этилена и малеинового ангидрида производится фирмой Monsanto (США). Фирма Miles-Yeda к этому сополимеру привязывает ферменты — трипсин, химотрипсин, папаин и субтилолептитазы А и В и выпускает соответствующие препараты под названиями энзайт-ЭМА-фермент. Эти препараты характеризуются высоким содержанием (~ 60%) связанного фермента. Свойства ферментов, связанных с ЭМА-носителями, интенсивно исследовались [24, 67]. Этот носитель со связанными протеиназами использован главным образом для приготовления ряда ингибиторов протеолитических ферментов [18, 20, 21, 28] и со связанными ингибиторами — для выделения протеиназ [19].

8.2.6. Полиакриламидные носители и их производные

Полиакриламидные гели построены из углеводного скелета, к которому присоединены амидные группы



Главный производитель полиакриламидных гелей — фирма Bio-Rad Labs. — выпускает их под названиями биогели Р; получают эти гели сополимеризацией акриламида и N'-N-метиленбисакриламида. Биогели Р имеют различные размеры пор: биогель Р-2 — предел исключения молекулярной массы 1800, биогель Р-300 — предел исключения 400 000. Все марки биогеля выпускаются с размерами гранул 50—100, 100—200, 200—400 и 400 меш. Наряду с перечисленными фирма производит ионообменные производные этих гелей, например слабокислый катионообменник биогель СМ, а также промежуточные продукты для получения сорбентов для аффинной хроматографии, такие, как аминокэтильное и гидразидное производные биогелей Р-2 и Р-60.

Для привязки аффинных лигандов, главным образом ферментов, фирма Koch-Light (Англия) производит энзакрилы. Энзакрил АН является гидразидным производным полиакриламидных гелей, а энзакрил АА — полиакриламидный гель, содержащий ароматические амины. Энзакрилполиацеталь — сополимер диметилацетата N-акрилоиламиноацетальдегида с N,N'-метиленбисакриламидом; энзакрилполиацеталь присоединяет белки, образуя связи с их NH₂-группами. Энзакрилполитиол — поперечносшитый сополимер акриламида и N-акрилоилцистеина. В присутствии окислителей он связывает белки, реагируя с их SH-группами.

Для введения SH-групп в фермент рекомендуется реакция фермента с тиолактоном N-ацетилгомоцистеина.

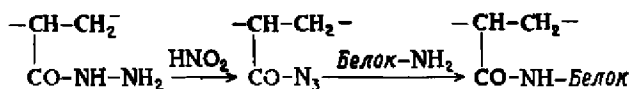
10 мг этого реагента растворяют в 0,5 мл карбонатного буфера (pH 10,6) и добавляют к раствору 100 мг фермента в 10 мл того же буфера. Через 60 мин смесь подвергают гель-фильтрации при 4°C через сефадекс G-25 (50×2 см) в карбонатном буфере (pH 10,6).

Энакрилполитиолактон содержит тиолактонное кольцо и связывает белки непосредственно через алифатические аминокруппы и фенольные оксигруппы.

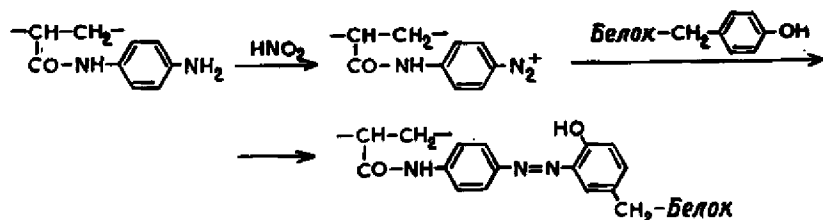
Полиакриламидные гели устойчивы при pH 1—10 и хорошо выдерживают все обычные элюенты. В них отсутствуют заряженные группы, и поэтому ионный обмен с хроматографируемыми веществами минимален. Полиакриламидные гели биологически инертны и не атакуются микроорганизмами, так как представляют собой синтетические полимеры. Поскольку частицы геля сильно прилипают к чистым стеклянным поверхностям, Инман и Динтцис [30] рекомендуют пользоваться лабораторной посудой из силиконизированного стекла или полиэтилена.

Реакцией с подходящим соединением полиакриламидные гели можно превратить в носители для связывания ряда аффинных лигандов [30]. Аминоэтильные производные готовят путем обработки большим избытком этилендиамина при 90°C, а гидразидные производные — избытком гидразина при 50°C. Аминоэтильные производные полиакриламидных гелей можно перевести в *n*-аминобензамидоэтильные производные реакцией с *n*-нитробензоилазидом в присутствии N,N-диметилформамида, триэтиламина и тиосульфата натрия.

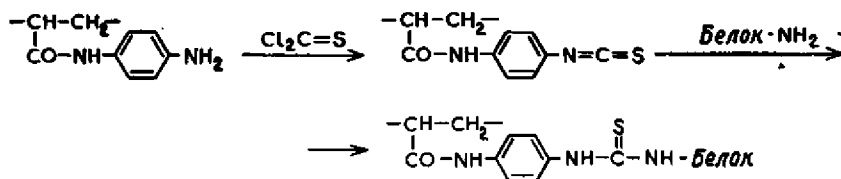
После активации азотистой кислотой гидразидное производное может привязывать аффинные лиганды через их аминокруппы



Полиакриламидные гели, содержащие остатки ароматических аминов, после диазотирования азотистой кислотой связывают аффинные лиганды преимущественно по их ароматическим остаткам



Те же гели, активированные тиофосгеном, связывают аффинные лиганды, реагируя со свободными аминогруппами последних



Методики присоединения белков на производных полиакриламидных гелей всех трех типов приведены ниже.

Присоединение белков к выпускаемым промышленностью производным полиакриламида (энзакрилам)

Присоединение аффинных лигандов к полиакриламидным гелям, содержащим ароматические амины (энзакрилу АА), после активации азотистой кислотой

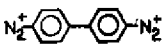
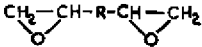
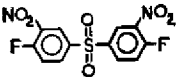
К охлажденной до 0°C суспензии 100 мг энзакрила АА в 5 мл 2 М соляной кислоте добавляют 4 мл охлажденного льдом 2%-ного нитрита натрия и смесь 15 мин перемешивают магнитной мешалкой. Образующийся диазоэнзакрил промывают 4 раза буфером, в котором будет присоединяться аффинный лиганд (например, фосфатным буфером, pH 7,5). После центрифугирования и декантации добавляют аффинный лиганд, например 2,5 мг фермента в 0,5 мл подходящего буфера. Реакционную смесь оставляют на 48 ч при перемешивании магнитной мешалкой. Реакцию заканчивают добавлением охлажденного льдом раствора фенола (0,01%) в ацетате натрия (10%-ный раствор). Через 15 мин энзакрил с присоединенным аффинным лигандом вначале отмывают разбавленным буфером, затем промывают тем же буфером, содержащим 0,5 моль/л хлорида натрия. Промывка должна быть проведена очень тщательно. Производитель (фирма Koch-Light) рекомендует сначала провести все операции с недиазотированным энзакрилом, чтобы определить лучшие условия для промывки адсорбированного материала. Аффинные лиганды, связанные с носителем по этой методике, могут быть снова получены в свободном виде в мягких условиях путем обработки 0,1 М дитионитом натрия в 0,2 М борате натрия при pH 9.

Присоединение аффинных лигандов к полиакриламидным гелям, содержащим ароматические амины (энзакрилу АА), после активации тиофосгеном

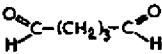
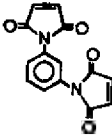
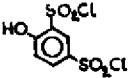
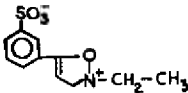
К суспензии, содержащей 100 мг энзакрила АА в 1 мл 3,5 М фосфатного буфера (pH 6,8—7,0), хорошо перемешиваемой магнитной мешалкой, прибавляют 0,2 мл 10%-ного тиофосгена в хлороформе. После 20-минутного интенсивного перемешивания прибавляют еще 0,2 мл раствора тиофосгена, а еще через 20 мин (перемешивание) NCS-энзакрил промывают один раз ацетоном, дважды 0,5 М бикарбонатом натрия и дважды буфером, используемым при присоединении лиганда (например, боратным буфером с pH > 8,5). После центрифугирования и декантации добавляют 0,5 мл раствора аффинного лиганда (например, 2,5 мг фермента) и реакцию проводят согласно предыдущей методике.

Активация гидразидных производных полиакриламидного геля (энзакрила АН) азотистой кислотой и последующее присоединение проводят таким же способом, как это описано для энзакрила АА.

Бифункциональные реагенты

Реагент	Формула	Основная реагирующая группа
Бисдiazобензидин		Фенольный HO—
3,6-Бис-(меркуриметил)диоксан	${}^+\text{Hg}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_2\text{O}_2-\text{CH}_2-\text{Hg}^+$	HS—
Бисоксираны		—OH к NH ₂ —
Диэтилмалонимидат	${}^+\text{NH}_2=\text{C}(\text{OCH}_2\text{C}_2\text{H}_5)-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OCH}_2\text{C}_2\text{H}_5)=\text{NH}_2^+$	H ₂ N—
<i>p,p'</i> -Дифтор- <i>m,m'</i> -динитродифенилсульфон		H ₂ N—, фенольный HO—
Диметиладипнимидат	${}^+\text{NH}_2=\text{C}(\text{OCH}_3)-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(\text{OCH}_3)=\text{NH}_2^+$	H ₂ N—
Диметилсуберимидат	${}^+\text{NH}_2=\text{C}(\text{OCH}_3)-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(\text{OCH}_3)=\text{NH}_2^+$	H ₂ N—
Дивинилсульфон	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	HO—
<i>N,N'</i> -Этиленбисооацетамид	$\text{ICH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NHCOCH}_2\text{I}$	HS—

Продолжение табл. 8.5

Реагент	Формула	Основная реагирующая группа
Глутаральдегид		H ₂ N—
Гексаметилендиизоцианат	$\text{O}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{O}$	H ₂ N—
N,N'-(1,3-Фенилен)бис-маленимид		HS—
Фенол-2,4-дисульфонил-хлорид		H ₂ N—
Реагент Вудворда		—COOH к NH ₂ —

Присоединение белков к полиакриламидным гелям с помощью глутарового альдегида

Уэстон и Аврамес [86] разработали метод прямого связывания аффинных лигандов полиакриламидными гелями с помощью глутарового альдегида, который, присутствуя в избытке, реагирует одной из своих альдегидных групп со свободной амидной группой полиакриламидного геля. Остающаяся свободная активная группа реагирует затем с аминогруппой аффинного лиганда, вводимого в последующей реакции связывания. Таким образом возникает прочная связь между носителем и аффинным лигандом.

Биогель Р-300 оставляют набухать в воде и дважды промывают 4-кратным объемом 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,9). Затем 19,4 мл геля (содержащего 1 г сухих гранул в объеме 45 мл) смешивают с раствором глутарового альдегида (4,8 мл 25%-ного раствора) и выдерживают 17 ч при 37 °С. Гель промывают и центрифугируют 4 раза с 4-кратным объемом 0,1 М фосфатного буфера

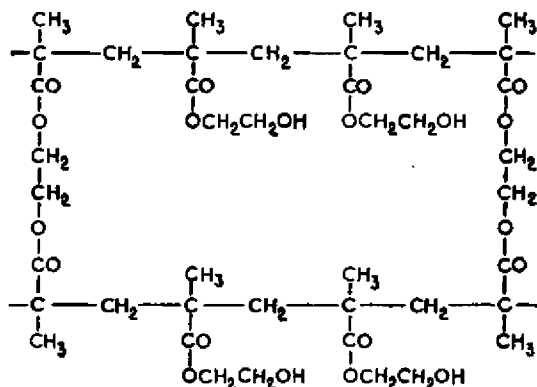
(рН 6,9), затем три раза 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,7). Присоединяемый белок вводят, смешивая 3 мл геля в 13,5 мл буфера, рН 7,7, и 0,3 мл раствора фермента (20 мг/мл) при 4 °С в течение 18 ч на встряхивателе (шейкере). После проведения реакции гель отделяют центрифугированием и промывают. Этим методом можно присоединить 70 мг кислой фосфатазы к 1 г сухого геля.

Ряд других бифункциональных производных, упомянутых главным образом Лоу и Дином [41], перечислены в табл. 8.5.

Примеры использования акриламидных гелей в аффинной хроматографии включены в табл. 11.1.

8.2.7. Оксисилметакрилатные гели

Гидрофильные оксисилметакрилатные гели, предложенные как носители для аффинной хроматографии Вихтерле и Лимом [88], получены Чоупеком и др. [9] полимеризацией суспензии оксисилированных эфиров метакриловой кислоты и алкилендиметакрилата при различных соотношениях мономера и инертных компонентов. Число реакционноспособных групп в геле, его пористость и удельная поверхность могут меняться в очень широких пределах. Гель имеет следующую структуру:



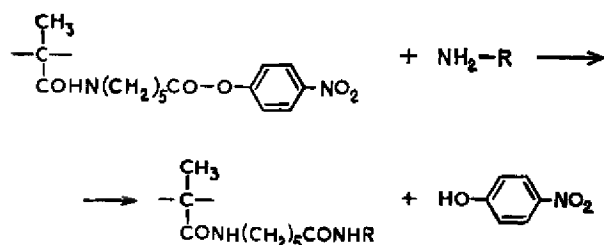
Гели выпускаются фирмами Lachema (ЧССР) и Realco Chemical Co. (США) под названием сферон.

Связывание химотрипсина и глицина на сферонах семи типов приведено в табл. 8.1. Гели образуют правильные сферические гранулы и различаются по химической и физической стабильности. Они хорошо выдерживают хроматографию под давлением и не меняют свою структуру после 8-часового нагревания при 150 °С в 1 М растворе гликолата натрия или после 24-часового кипячения в 20%-ной соляной кислоте. Они биологически инертны и, подобно акриламидным гелям, не атакуются микроорганизмами. С ними можно работать в присутствии органических растворителей, которые имеют некоторые преимущества при связывании

пептидов с этими гелями [79]. Гидроксильные группы геля обладают свойствами, аналогичными свойствам агарозы. После активации бромцианом эти группы связывают аффинные лиганды через их аминогруппы точно так же, как и в случае сефарозы [77, 80]. Активация геля и связывание аффинного лиганда по существу идентичны методикам, описанным для связывания на агарозе.

Связывание белков и пептидов на оксисилметакрилатных гелях с помощью активированных эфиров [10, 77]

Аминокислоты и белки присоединяются к *n*-нитрофениловым эфирам производных оксисилметакрилатного геля (НФОМ) по схеме



Скорость освобождения *n*-нитрофенола может быть определена путем измерения оптической плотности раствора при 400 нм. Одновременно со связыванием аминокислот или белков на НФОМ-геле имеет место гидролиз *n*-нитрофениловых эфиров в водной среде в присутствии избытка гидроксил-ионов. На рис. 8.4 показано влияние pH на освобождение *n*-нитрофенола при связывании фенилаланина на НФОМ-геле. Зависимость от pH эффективности связывания фенилаланина и сывороточного альбумина на НФОМ-гелях иллюстрируется данными табл. 8.6. Очевидно, что наибольшие количества фенилаланина связываются при pH 9. Этот выра-

Таблица 8.6

Иммунизация фенилаланина и сывороточного альбумина человека на НФОМ-геле в зависимости от pH среды

pH	Фенилаланин, мкмоль/г	Сывороточный альбумин, мкмоль/г
7	Следы	—
8	1,12	0,138
9	16,1	0,156
10	3,83	0,151
11	1,68	0,112
12	Следы	0,125

женный оптимум pH обусловлен величиной pK α -аминогруппы аминокислот (7,6—8,4). Поскольку НФОМ-гель связывает аминокислоты только по их аминогруппам в непротонированной форме, эти кислоты только в очень небольших концентрациях способны сорбироваться аффинным носителем при pH 7 и 8. При $pH > 8,5$ количество присоединяемого фенилаланина значительно воз-

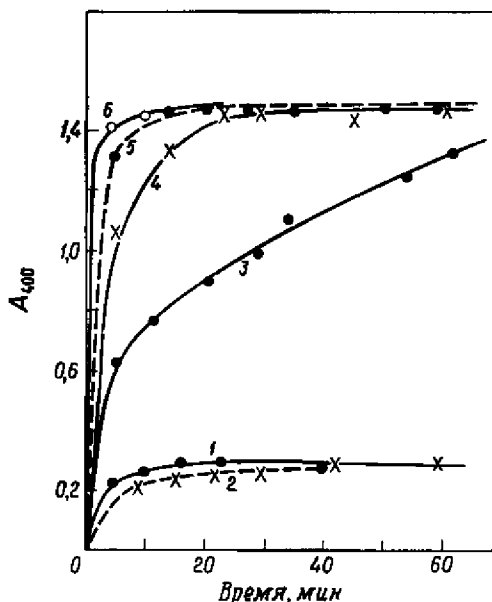


Рис. 8.4. Зависимость от pH (буферные растворы Бригтона — Робинсона) отщепления *p*-нитрофенола в ходе связывания фенилаланина на НФОМ-геле.

1 — pH 7; 2 — pH 8; 3 — pH 9; 4 — pH 10; 5 — pH 11; 6 — pH 12.

растает. Напротив, при $pH \geq 10$ наблюдается существенное уменьшение содержания связанного фенилаланина из-за увеличения концентрации конкурирующих гидроксильных ионов, которые значительно ускоряют гидролиз.

В табл. 8.6 показана кроме того зависимость количества связанного сывороточного альбумина от pH. Наибольшее количество связывается также при pH 9. При более высоких pH в случае белка наряду с возрастанием концентрации гидроксильных ионов растет и число NH_2 -групп, способных связываться (для ϵ -аминогрупп лизина pK 9,4—10,6). Из характера зависимости количества фенилаланина, связанного с НФОМ-гелем, от концентрации фенилаланина, взятого для связывания, установлено, что для наилучшего связывания необходима относительно высокая кон-

центрация аминокислоты. Например, при концентрации фенилаланина 10 мкмоль/мл на 1 г геля связывается 10 мкмоль фенилаланина, в то время как при концентрации фенилаланина 50 мкмоль/мл — только 30 мкмоль.

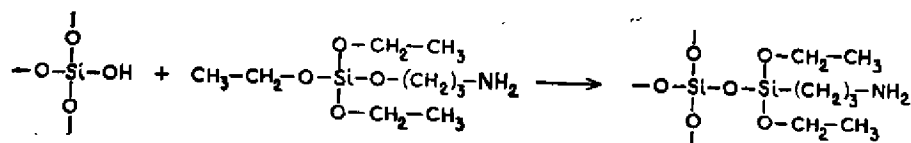
Для связывания пептидов и белков использовались также метакрилатные гели с эпоксидными группами. Изучение реакции с глицил-L-лейцином и ацетил-L-лейцином показало, что связывание α -аминогруппы с эпоксигруппой существенно зависит от pH (оптимальное значение pH 9,7), в то время как связывание карбоксильной группы, по-видимому, от pH не зависит. Этот факт, а также то обстоятельство, что скорость реакции ϵ -аминогруппы с эпоксидной группой на порядок ниже скорости для α -аминогруппы, по-видимому, могут объяснить, почему присоединение сывроточного альбумина и трипсина к этим гелям эффективнее при кислых, чем при щелочных pH [78].

Обзор применений сферонов включен в табл. 11.1.

8.2.8. Стекло и его производные

Наиболее важным неорганическим нерастворимым носителем без сомнения является стекло, которое очень часто используется для приготовления иммобилизованных ферментов и реже сорбентов для аффинной хроматографии. В табл. 8.7 перечислены марки некоторых хроматографических пористых стекол и фирмы, производящие их.

Модифицированные стекла обладают превосходной устойчивостью и не атакуются микроорганизмами. Однако в некоторых случаях они обнаруживают нежелательную неспецифическую адсорбцию [14]. В проспектах фирмы Corning Glass Works рекламируется стекло, обработанное γ -аминопропилтриэтоксисиланом, как подходящий носитель для ряда аффинных лигандов [46, 82, 83]. Найдено, что процесс силинизации представляет собой реакцию гидроксильных групп на поверхности стекла с аминофункциональным силаном



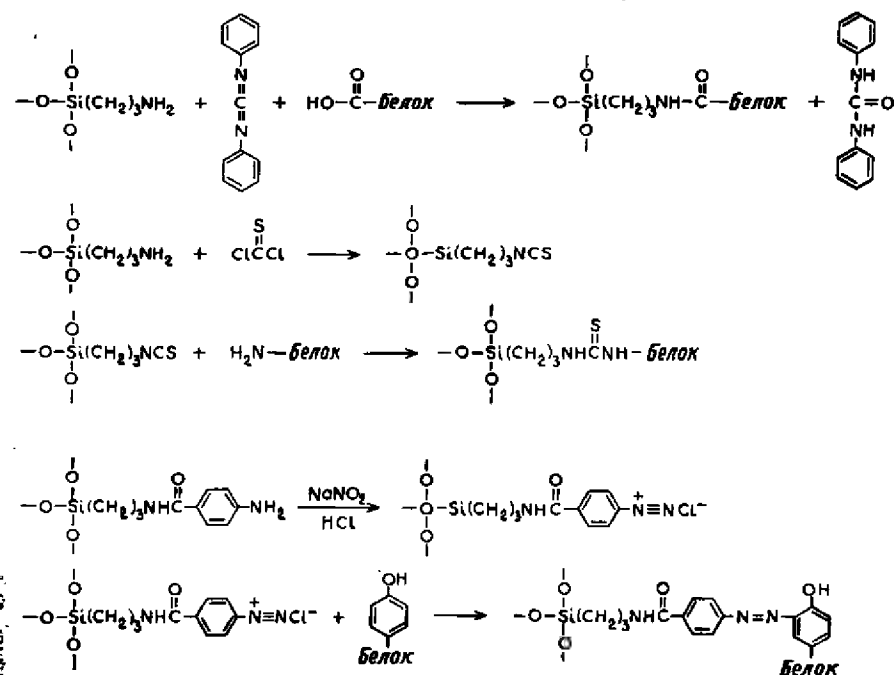
Реакция протекает в метиловом спирте и воде при 25°C, и образующееся алкиламиностекло может быть использовано для иммобилизации аффинных лигандов и ферментов. Аффинные лиганды могут быть связаны с аминогруппами производных стекла своими карбоксильными группами при использовании раствори-

Таблица 8.7

Пористые стеклянные хроматографические материалы

Марка	Предел исключения молекулярной Массы по		Фирма-производитель
	декстразам	полистиролам	
Биоглас 200		30 000	Bio-Rad Labs., США
Биоглас 500		100 000	
Биоглас 1000		500 000	
Биоглас 1500		2 000 000	
Биоглас 2500		9 000 000	
CPG-10-75	28 000		Waters Assoc., США; Corning Glass Works, США
CPG 10-125	48 000		
CPG 10-175	68 000		
CPG 10-240	95 000	120 000	
CPG 10-370	150 000	400 000	
CPG 10-700	300 000	1 200 000	
CPG 10-1250	550 000	4 000 000	
CPG 10-2000	1 200 000	12 000 000	

мого карбодимида, своими аминогруппами после активации тиофосгеном, а также ароматическими остатками азосвязью с производными ариламинов, как это видно на следующей схеме:



Примеры использования стекла в аффинной хроматографии приведены в табл. 11.1.

8.2.9. Другие носители

К носителям, используемым для аффинной хроматографии (табл. 11.1) отнесены также и такие, как сополимеры аминокислот, виниловые сополимеры, найлоновые и полистирольные матрицы, окись никеля; подробности, касающиеся их применения, можно найти в цитируемой литературе. Из упомянутых носителей в продаже имеются полистирольные гели, которые известны, например, под названиями порагель, стирагель и аквапак (фирма Waters Assoc., США), биобедс (фирма Bio-Rad Labs., США), меркогель (на основе поливинилацетата; фирма E. Merck, ФРГ).

8.3. ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ГРУППЫ

Если низкомолекулярные соединения функционируют в качестве аффинных лигандов, то для приготовления эффективного специфического сорбента необходимо в большинстве случаев ввести так называемую пространственную «ножку», т. е. пространственную группу между аффинным лигандом и поверхностью нерастворимого носителя. Вопрос о пространственной доступности низкомолекулярных аффинных лигандов для комплементарных участков биологических макромолекул детально уже обсуждался в разд. 5.1.

При синтезе аффинного геля возможны два подхода. Согласно первому, лиганд (в состав которого входит пространственная группа) синтезируется в свободном виде в растворе классическими методами органической химии, очищается и присоединяется к матрице геля на последней стадии. Некоторые исследователи предпочитают именно этот подход, поскольку в гель не вводятся незащищенные пространственные группы, которые содержат ионные группировки, обуславливающие неспецифическую сорбцию; этот вопрос подробно рассматривается в разд. 10.3. Второй подход состоит во встраивании пространственной группы в гель на первой стадии с последующим связыванием аффинного лиганда на второй стадии. Берри и сотр. [3] сравнили две методики и показали преимущества последней. Привязка пространственной группы к гелю с последующим прикреплением аффинного лиганда обычно технически менее сложна, особенно для неспециалистов в органической химии.

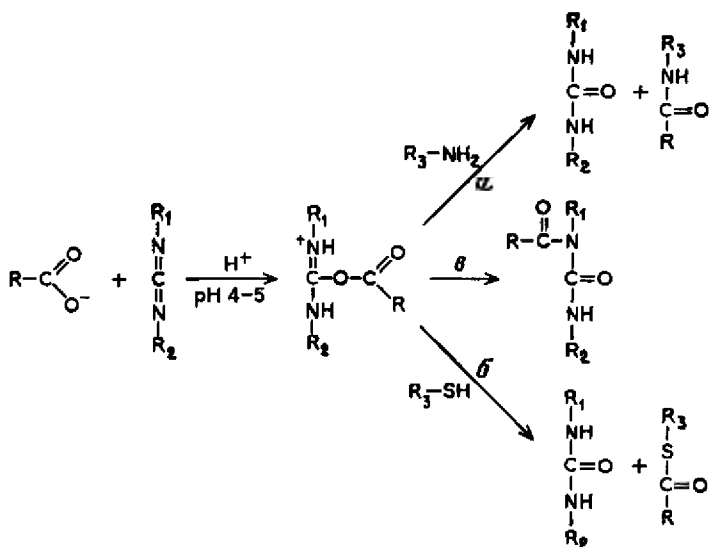
При этом отпадает вопрос о введении и удалении защитных

групп. При твердофазном синтезе значительно облегчается удаление непрореагировавших соединений, поскольку они могут быть удалены простой промывкой. Однако первый метод требует обычно сложного фракционирования аффинных лигандов, модифицированных пространственной группой. Хотя связывание пространственной группы с агарозой проводится, как правило, в водной среде, имеется ряд примеров применения неводных растворителей, например пиридина или метанола, при связывании аффинных лигандов на пространственной группе. Среди реакций присоединения имеются и такие, использование которых для привязки пространственных групп приводит к сшиванию геля, что ведет к его стабилизации.

Берри и др. [3] подчеркивают, что неспецифическое связывание обусловлено не столько наличием незамещенных пространственных групп, сколько природой их связи с носителем (например, появлением положительного заряда после привязки алкиламина к агарозе после активации бромцианом; ср. разд. 8.2.4) и, более того, природой самого носителя (гидрофобные взаимодействия в случае гидрофобных пространственных групп), а также побочными реакциями, сопровождающими связывание. В качестве примера приводится часто используемый метод привязки аффинного лиганда с помощью водорастворимых карбодимидов. Когда NAD^+ присоединяют к иммобилизованной пространственной «ножке», между аминогруппами адениновых остатков и карбоксильными группами «ножек» должны образоваться амидные связи, если для конденсации применяется карбодимид. Однако Берри и О'Карра [4] показали, что образуется эфирная связь с гидроксильными группами остатков рибозы. Поэтому для присоединения нуклеотидов к пространственной группе они рекомендуют другие методы. Внимательное изучение табл. 11.1, где всегда указывается, присоединяется ли пространственная группа к аффинному лиганду или к нерастворимому носителю, позволяет сделать вывод о пользе индивидуального подхода в выборе методики.

В настоящее время привязка пространственных групп к нерастворимому носителю преобладает.

Как видно из табл. 11.1, одними из наиболее частых комбинаций геля и пространственной группы, используемых для связывания низкомолекулярных аффинных лигандов, являются сефароза с присоединенным гексаметилендиамином (в продажу поступает как АН-сефароза) или сефароза с ϵ -аминокапроновой кислотой (СН-сефароза). Для их связывания с аффинными лигандами, несущими первичную алифатическую или ароматическую amino- или карбоксигруппу, используется реакция конденсации (карбодимидный метод). Ниже приведена схема этой реакции



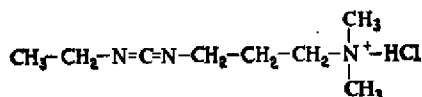
В качестве конечной стадии может быть:

а) нуклеофильная атака, приводящая к получению ацилнуклеофильного продукта и мочевины соответствующего карбодиимида;

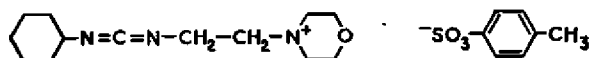
б) образование тиозфирной связи;

в) превращение промежуточной О-ацилизомочевины в N-ацилмочевину в результате внутримолекулярного переноса ацильного остатка. Связывание карбоксильной группы с нуклеофилом может протекать почти количественно в присутствии избытка карбодиимида и нуклеофильного реагента.

Для синтеза сорбентов используются преимущественно водорастворимые карбодиимиды, такие, как хлоргидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК)



и мето-*п*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида (ЦМК).



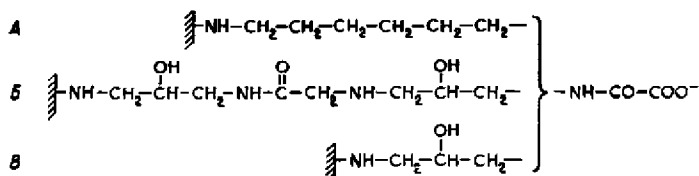
Главное преимущество этих карбодиимидов состоит в том, что соответствующие производные с мочевиной растворимы в воде и поэтому могут быть легко удалены из геля промыванием водой. По Лоу и Дину [41] конденсация с помощью карбодиимида проводится при рН 4,7—6,5 в течение 15—72 ч при концентрации карбодиимида 2—100 мг/мл.

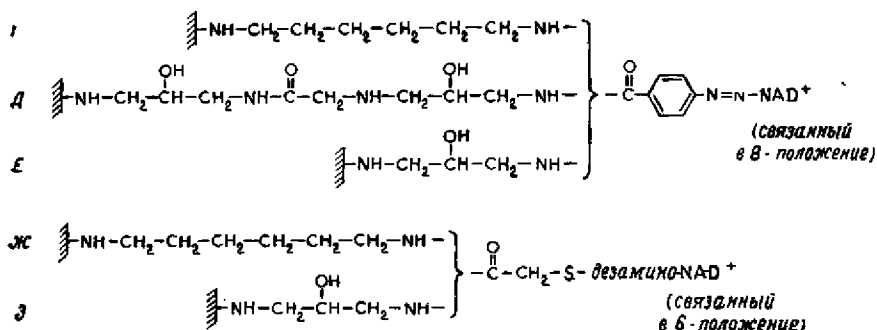
В качестве примера ниже описано приготовление эстрадиолсефарозы [12].

300 мг 3-О-сукцинил-[³]эстрадиола в 400 мл диметилформамида добавляют к 40 мл влажной аминоэтил-сефарозы 4В. Диметилформамид требуется для растворения эстрадиола; если аффинные лиганды растворимы в воде, в нем нет необходимости. Добавляя 1 н. соляную кислоту, в суспензии поддерживают рН 4,7. Затем в течение 5 мин прибавляют 500 мг (2,6 ммоль) 1-этил-3-(диметиламинпропил)карбодиимида в 3 мл воды и реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на 20 ч. Замещенную сефарозу переносят в колонку и промывают 50%-ным водным раствором диметилформамида до отсутствия радиоактивности в элюате. Рекомендуется для промывания использовать 10 л раствора и проводить его в течение 3—5 дней. По этой методике 1 мл влажной сефарозы может связать ~ 0,5 мкмоль эстрадиола.

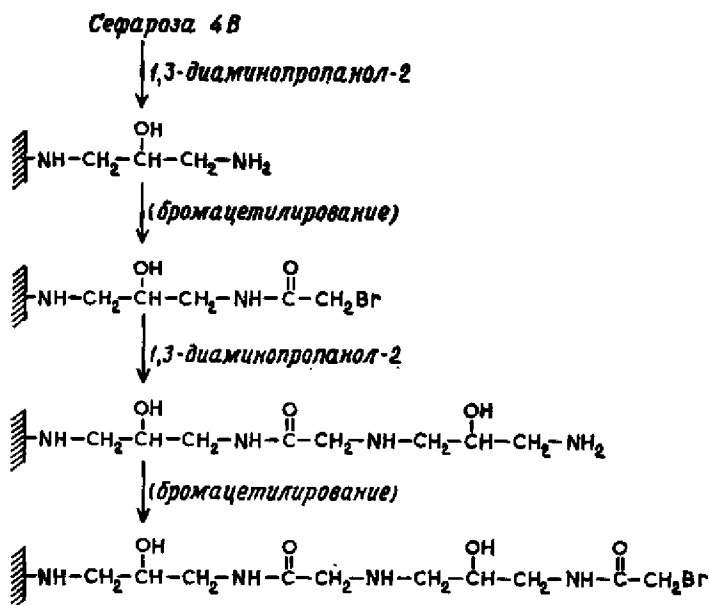
Из других производных сефарозы Куатреказас [12] приготовил бромацетамидоэтил-сефарозу реакцией О-бромацетил-N-оксисукцинимидом с аминоэтил-сефарозой, сукцинилиламиноэтил-сефарозу реакцией с янтарным ангидридом, производные диазония из п-аминобензамидоэтил-сефарозы, а также тирозил-сефарозу и сульфгидрил-сефарозу. Присоединение аффинных лигандов со свободными карбоксильными группами к сульфгидрил-сефарозе осуществлялось посредством тиосложноэфирных связей с помощью водорастворимых карбодиимидов. И напротив, к носителям, содержащим карбоксильные группы, с помощью карбодиимида можно присоединить соединения, содержащие тиольные группы. Тиосложноэфирная связь может быть специфически расщеплена гидроксиламином, что создает возможность простого отделения интактного комплекса лиганд—белок от матрицы.

В разд. 5.1 обсуждались гидрофобные и гидрофильные свойства пространственной группы. О'Карра и др. [51] упоминают три типа аффинных лигандов, иммобилизованных через гидрофобные (А, Г и Ж) и гидрофильные (Б, В, Д, Е и З) пространственные группы: А—В—иммобилизованный оксамат; Г—Е—азо-NAD⁺-связанный в 8-положение; Ж и З—6-меркаптопуриновый аналог NAD⁺, связанный в 6-положение (заштрихованные части слева представляют матрицу сефарозы 4В).





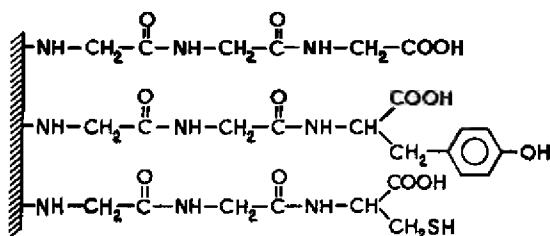
Нижеприведенная схема синтеза гидрофильной пространственной группы взята из той же работы



В большинстве случаев гидрофобный характер пространственных групп приводит к значительным осложнениям из-за возникновения неспецифических гидрофобных взаимодействий, и, следовательно, желательно избегать использования таких пространственных групп, отдавая предпочтение пространственным группам с гидрофильными свойствами.

Другие методы включения гидрофильных пространственных групп уже упоминались в разд. 8.2.4 при рассмотрении связыва-

ния с помощью бисоксиданов. Примерами гидрофильных пространственных групп могут служить также олигопептидные цепи



В разд. 8.2.4 обсуждалась проблема освобождения алкиламинных пространственных групп, связанных с активированной бромцианом агарозой; эта проблема рассматривается также далее в разд. 8.5. Для предотвращения десорбции лигандов со специфических сорбентов лучше всего использовать многозарядные пространственные группы [89—92]. Устойчивые производные агарозы с высокой емкостью можно получить путем присоединения полилизина или мульти-поли-D, L-аланилполилизина к сефарозе, активированной бромцианом. К недостаткам получаемых таким образом производных относятся их ионообменные свойства, однако такие свойства отсутствуют при связывании на активированной бромцианом сефарозе гидразидов. Присоединенная к носителю пространственная группа характеризуется низким значением pK (4,2), поэтому сорбент не обладает ионообменными свойствами в нейтральных и щелочных средах.

Получение полиакрилгидразид-агарозы

Получение полиметилакрилата

Лаурилсульфат натрия (0,25 г), свежеперегнанный метилакрилат (5 мл), 10%-ную тиогликолевую кислоту (1 мл) и персульфат аммония (0,125 г) последовательно при перемешивании магнитной мешалкой (под тягой) добавляют к 50 мл дистиллированной воды. Эмульсию нагревают с обратным холодильником 2,5 ч на водяной бане (80°C) до исчезновения запаха метилакрилата.

После полимеризации эмульсию вливают при перемешивании в 100 мл деионизированной воды, к которой добавляют 100 мл 2 н. соляной кислоты. Продукт, который коагулирует в виде белых хлопьев, выдерживают 30 мин на холоду. Затем промывают декантацией большим количеством холодной воды.

Получение полиакрилгидразида

Полиметилакрилат (5 г) диспергируют в 70 мл гидразингидрата (98%-ный раствор). Реакционную смесь энергично перемешивают и нагревают при 100°C на кипящей водяной бане. Через 3 ч нагревания получают прозрачный густой раствор. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, нерастворимые частицы отфильтровывают через марлю и фильтрат вливают при постоян-

ном перемешивании в 500 мл охлажденного во льду метилового спирта, содержащего 1 мл ледяной уксусной кислоты. Осадок отфильтровывают, промывают холодной смесью метанола и уксусной кислоты (500:1) и вновь растворяют в 150 мл воды. Нерастворимые частицы удаляют фильтрованием. Этот раствор может быть немедленно использован для присоединения к сефарозе или лиофильно высушен с предосторожностями при удалении даже небольших следов влаги, чтобы не произошло сшивания продукта.

Получение полиакрилгидразид-сефарозы

Сефарозу 4В активируют бромцианом. Активированную сефарозу суспендируют в трех объемах охлажденного раствора полиакрилгидразида в воде или 0,1 н. бикарбонате натрия (см. предыдущую методику) и реакционную смесь при слабом перемешивании оставляют на ночь при 4 °С. Конъюгат промывают 0,1 М хлорида натрия до отрицательной реакции (отсутствие окрашивания промывных вод с 2,4,6-тринитробензолсульфонатом натрия). Получают носитель, содержащий в 1 мл агарозы до 120 мкмоль/мл доступного гидразида.

Производные с содержанием гидразида 15,25 мкмоль/мл использованы для дальнейших замещений тем же методом, который описан для присоединенных монофункциональных гидразидов. Методы приготовления производных гидразид-сефарозы показаны на рис. 8.5.

Производные полиакрилгидразид-сефарозы ведут себя как идеальные нерастворимые носители для аффинной хроматографии. Они сохраняют свойства сефарозы, в особенности минимальное неспецифическое взаимодействие с белками, хорошие фильтрующие свойства и высокую пористость. Кроме того, они механически и химически устойчивы. Эти производные обладают также преимуществами акриламидных гелей. При нейтральных pH они не несут заряда и содержат большое число групп, способных модифицироваться.

8.4. БЛОКИРОВАНИЕ НЕПРОРЕАГИРОВАВШИХ ГРУПП

Когда связывание аффинного лиганда на нерастворимом носителе закончено, рекомендуется удалить остающиеся активные группы, чтобы исключить дальнейшее связывание. Если аффинный лиганд связывается своими аминокруппами, в качестве инактивирующих агентов наиболее часто используются низкомолекулярные первичные амины. Например, согласно рекомендациям фирмы Pharmacia, при связывании на сефарозе, активированной бромцианом, инактивация остающихся активных групп может быть достигнута достаточно просто при взаимодействии с 1 М 2-аминоэтанолом при pH 9 и комнатной температуре в течение 2 ч, в то же время после связывания на эпоксиактивированной сефарозе для инактивации в тех же условиях требуется 4 ч. Используется тот же буфер, что и при связывании, например 0,1 М бикарбонат натрия, содержащий 0,5 моль/л хлорида натрия. Для бло-

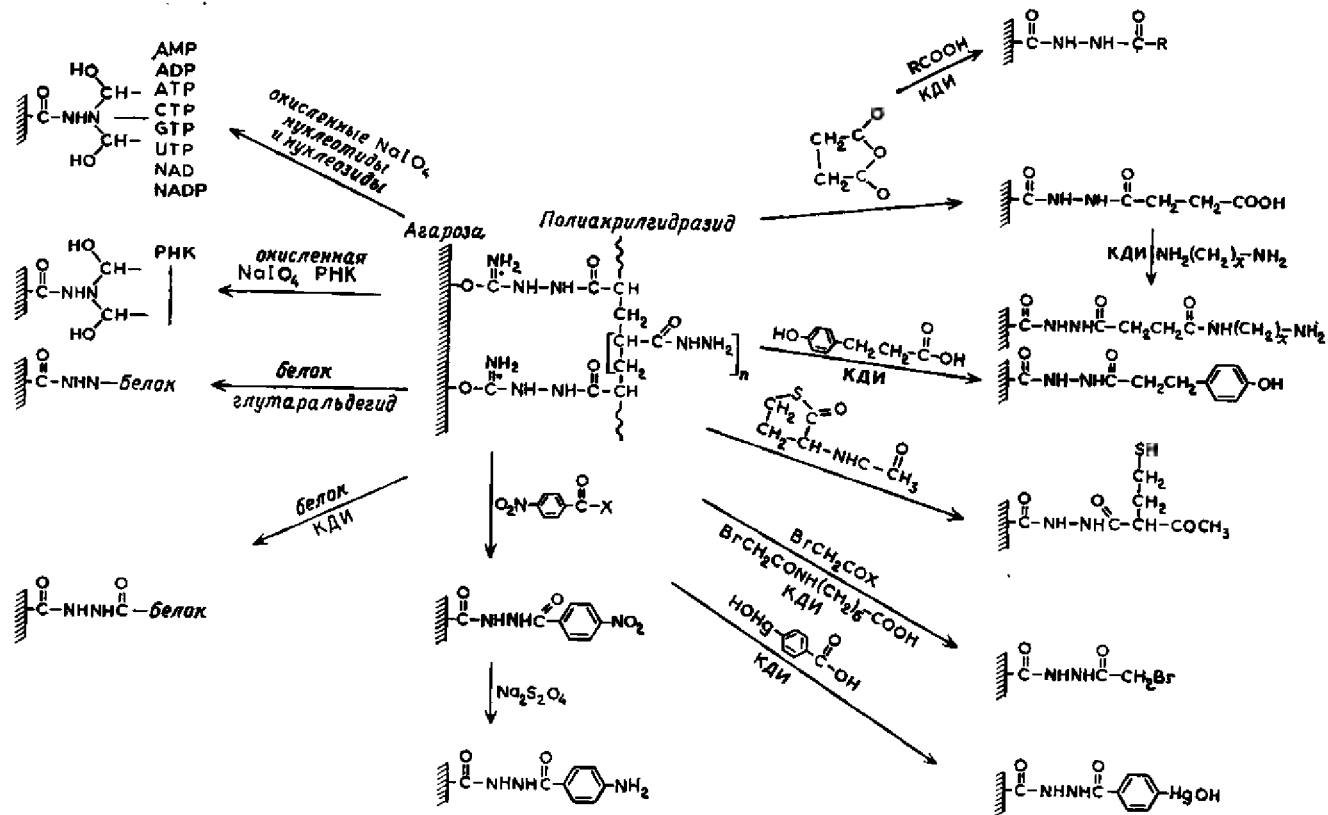


Рис. 8.5. Методы получения производных гидразид-сефарозы [90].

кирования используются и другие первичные низкомолекулярные амины, такие, как глюкозамин. Сандберг и Хёглинд [69] использовали насыщенный раствор глицина (в карбонатном буфере, pH 9,5) и показали, что он не вносит вклада в неспецифическую сорбцию. Смит [68] также исследовал инактивацию глицином групп активированной бромцианом сефарозы. Действие 10 М глицина при 2°C в трис-буферном солевом растворе (pH 8,5) фактически предотвращает последующее связывание $\gamma\text{G}-[^{131}\text{I}]$ глобулина. Рош и др. [62] блокировали группы активированной бромцианом сефарозы после связывания подчелюстного муцина 2-амино-2-оксиметилпропандиолом-1,3, а Ратнер [60] после связывания РНК-полимеразы нейтрализовал остающиеся активные группы промывкой 0,1 М 2-меркаптоэтанола. Фирма рекомендует для удаления активных групп активированной бромцианом сефарозы суспендировать гель в трис-буфере (pH 8) в течение 2 ч. Влияние тех немногих зарядов, которые вводятся при использовании триса или глицина, можно подавить, если использовать относительно высокие концентрации солей при аффинной хроматографии. Почти полное удаление этих активных групп может быть, однако, достигнуто даже при простом стоянии геля в течение ночи в слабощелочном растворе.

В гелях, которые содержат активные сложноэфирные группы для прямого ковалентного связывания (например, активированная CN-сефароза, аффигель 10 или оксиалкилметакрилатные гели с *n*-нитрофенильной сложноэфирной группой), непрореагировавшие группы удаляют путем обработки 0,1 М трис-буфером (pH 8): через 1 ч в геле практически не остается групп, способных связывать белки или пептиды. Для носителей, которые содержат альдегидные группы в качестве активных связывающих групп, после связывания преимущественно используется восстановление борогидридом натрия. При этом происходит и восстановление остающихся альдегидных групп, стабилизация связей между белком и нерастворимой матрицей.

Если аффинный лиганд связан с пространственной группой, может случиться, что часть молекул пространственной группы, обычно содержащих на своем конце амино- или карбоксигруппы, остается незанятой. Непрореагировавшие карбоксильные группы пространственных «ножек» Рейфестин и др. [59] удаляли блокированием 0,5 мМ трис-(2-амино-2-оксиметилпропандиолом-1,3) и 1,6 мМ *N*-циклогексил-*N'*-[2-(4-морфолин)этил]карбодимид-метол-толуолсульфонатом. Ниже приводится методика блокирования карбоксильных групп, предложенная Уайтли и др. [87].

15 мл сефарозы, содержащей привязанный через гексаметилендиамин и янтарный ангидрид 5-фтор-2'-дезоксигуанидин-5'-(*n*-аминофенил)фосфат, суспендируют в 50 мл смеси (1:1 по объему) диметилформамида и 0,1 М какодилатного буфера (pH 4,5), содержащих 1,1 г глицинамида. К суспензии добавляют

2 г хлоргидрата 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида, растворенного в 10 мл той же смеси, и перемешивают 12 ч при комнатной температуре. Если аффинный лиганд привязан к СН- или АН-сефарозе с помощью реакции с карбодимидом, фирма рекомендует продолжить связывание (после привязки аффинного лиганда) с помощью карбодимида с глюкозаминном [17] или 2-аминоэтанолом в случае СН-сефарозы или с уксусной кислотой в качестве блокирующего агента для аминогрупп АН-сефарозы.

Незамещенные аминогруппы могут быть блокированы также уксусным ангидридом [32].

Суспензию 60 мл сефарозы, к которой D-галактоно- α -лактон привязан через бензидин, озвучивали в 100 мл воды, содержащей 2 мл уксусного ангидрида, в течение 10 мин в резонаторе типа бани.

Блокирование непрореагировавших аминогрупп с помощью уксусного ангидрида использовали также Гиеровский и Бродерсен [27], однако при этом происходило освобождение билирубина, привязанного к АН-сефарозе карбодимидным методом.

При получении специфических сорбентов перед аффинной хроматографией необходима еще одна подготовительная стадия, заключающаяся в тщательном промывании ото всех веществ, которые ковалентно не связаны с поверхностью нерастворимой матрицы. Наиболее часто лучшие результаты получались, если промывки проводились либо щелочными, либо кислыми буферными растворами с высокой ионной силой (разд. 8.2).

8.5. ДЕСОРБЦИЯ ПРИСОЕДИНЕННОГО АФФИННОГО ЛИГАНДА

Серьезным ограничением использования аффинной хроматографии в системах с высоким сродством (например, гормон-рецепторные взаимодействия) и для выделения пико- и наномольных количеств белков является относительно легкое отщепление аффинных лигандов в раствор. Эти аффинные лиганды связаны преимущественно монофункционально с активированной бромцианом сефарозой через пространственную группу. Механизм отщепления аффинных лигандов, связанных с активированной бромцианом сефарозой, в присутствии соединений, содержащих нуклеофильные группы, обсуждался в разд. 8.2.4. Освобождение лиганда из агарозы с привязанным 8-(ϵ -аминокапроил-3-аминоэтилтио)аденозин-3',5'-цикломонофосфатом в зависимости от времени и pH показано на рис. 8.6 [74].

Для более подробного изучения десорбции аффинных лигандов со специфических сорбентов Тессер и др. [75] готовили сорбенты путем привязывания аденозин-3',5'-цикломонофосфата и других веществ через различной длины пространственные группы к активированному бромцианом агарозе, целлюлозе и шитому декстрану, а также к полиакриламиду через образование амидной связи с карбо-

кислыми группами носителя по Инману и Динтцису [30]. Число индивидуальных отщепляемых лигандов зависит от pH и времени; из характера этой зависимости следует, что десорбция аффинных лигандов с матрицы происходит преимущественно в местах прикрепления к поверхности нерастворимого носителя и что она может быть усилена в полнакриламидных гелях анхимерным влиянием соседних карбоксильных и амидных групп, а в агарозе, целлюлозе и сшитых декстранах — гидроксильных групп. Реакция освобождения не зависит от структуры связанного аффинного лиганда. Аффинные лиганды, связанные с полиакриламидными гелями связи типа $R-NH-CO-$ акриламидный гель, отщепляются медленнее. Десорбция дезоксикортикостероидов и эстриолов из конъюгатов с агарозой описана Луденсом и др. [43], эстрадиола — Сикой и др. [66], а ϵ -ДНФ-лизина — Вильчеком [89]. Йонг [95] наблюдал постоянную десорбцию катехоламинов и пропанола из их химических соединений с сфарозой и стеклом, а Вокелен и др. [81] — десорбцию изопротеренола, связанного с агарозой.

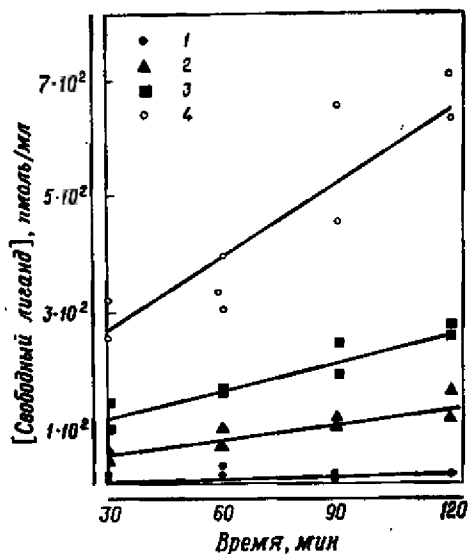


Рис. 8.6. Отщепление лиганда от агарозы с прикрепленным через пространственную группу цикло-АМР в зависимости от времени и pH [74].

1 — ацетат натрия (pH 5); 2 — имидазол+HCl (pH 6); 3 — трис-HCl (pH 7); 4 — трис-HCl (pH 8); комнатная температура; среда содержала 0,005 М буфер и 0,015 М NaCl [74].

Отщепление связанных лигандов можно уменьшить, если использовать связывание через полифункциональные пространственные группы (разд. 8.3). Снизить десорбцию, кроме того, можно, если для связывания использовать реакции, увеличивающие прочность связи аффинного лиганда с носителем, а именно при использовании метода периодатного окисления или метода присоединения к эпоксиактивированной агарозе. Парих и др. [52] изучили изменение степени десорбции в зависимости от используемого носителя. При выделении рецепторов экстрогена и инсулина невозможно применить, например, стекло и полиакриламидные носители из-за исключительно быстрой десорбции аффинных лигандов.

к поверхности нерастворимого носителя и что она может быть усилена в полнакриламидных гелях анхимерным влиянием соседних карбоксильных и амидных групп, а в агарозе, целлюлозе и сшитых декстранах — гидроксильных групп. Реакция освобождения не зависит от структуры связанного аффинного лиганда. Аффинные лиганды, связанные с полиакриламидными гелями связи типа $R-NH-CO-$ акриламидный гель, отщепляются медленнее. Десорбция дезоксикортикостероидов и эстриолов из конъюгатов с агарозой описана Луденсом и др. [43], эстрадиола — Сикой и др. [66], а ϵ -ДНФ-лизина — Вильчеком [89]. Йонг [95] наблюдал постоянную десорбцию катехоламинов и пропанола из их химических соединений с сфарозой и стеклом, а Вокелен и др. [81] — десорбцию изопротеренола, связанного с агарозой.

Математический подход к десорбции лиганда в аффинной хроматографии [25]

Гидролитическое расщепление множественных связей молекулы связанного лиганда с матрицей можно описать процессом, состоящим из последовательных реакций. Если допустить, что кинетика этих реакций подчиняется псевдопервому порядку, что согласуется с предложенным механизмом десорбции, и константы последовательных реакций имеют одно и то же значение, то можно вывести выражение для концентрации свободных лигандов C_N . Если известна общая концентрация фиксированного лиганда, т. е. содержание (в мкмольях) в 1 мл влажного геля, то

$$a = C_A + C_B + \dots + C_N.$$

Разрыв связей описывается соответствующими уравнениями. Для первой связи ($A \rightarrow B$)

$$-dC_A/dt = kC_A \longrightarrow \int dC_A/C_A = -k \int dt \longrightarrow C_A = ae^{-kt}, \quad (8.1)$$

для второй связи ($B \rightarrow C$)

$$dC_B/dt = kC_A - kC_B = kae^{-kt} - kC_B$$

или

$$dC_B/dt + kC_B = kae^{-kt}.$$

Решение этого дифференциального уравнения и аналогичных уравнений для реакции $C \rightarrow D$, $D \rightarrow E$ и т. д. по методу Теорелла приводит к

$$C_A = ae^{-kt} = a \frac{(kt)^0}{0!} e^{-kt},$$

$$C_B = akte^{-kt} = a \frac{(kt)^1}{1!} e^{-kt},$$

$$C_C = \frac{1}{2} a (kt)^2 e^{-kt} = a \frac{(kt)^2}{2!} e^{-kt},$$

$$C_M = \frac{1}{2} \frac{1}{(n-1)!} a (kt)^{n-1} e^{-kt} = a \frac{kt^{n-1}}{(n-1)!} e^{-kt}.$$

Комбинация этих уравнений с уравнением (8.1) приводит к выражению

$$C_N = a - ae^{-kt} \sum_{p=0}^{n-1} \frac{(kt)^p}{p!}. \quad (8.2)$$

Для каждого n можно построить зависимость C_N/a от kt . Для значений n от 1 до 6 результаты приведены на рис. 8.7. Видно, что при $n > 1$ между началом реакций отщепления и появления первых свободных молекул лиганда имеется индукционный пери-

од. Этот период увеличивается с возрастанием n и с уменьшением k . Из уравнения (8.2) можно определить время половинной десорбции (τ), если положить C_N равной $a/2$

$$e^{-k\tau} \sum_{p=0}^{n-1} \frac{(k\tau)^p}{p!} = \frac{1}{2}. \quad (8.3)$$

Поскольку это уравнение трансцендентальное, для него нельзя получить точного аналитического решения. Результаты графиче-

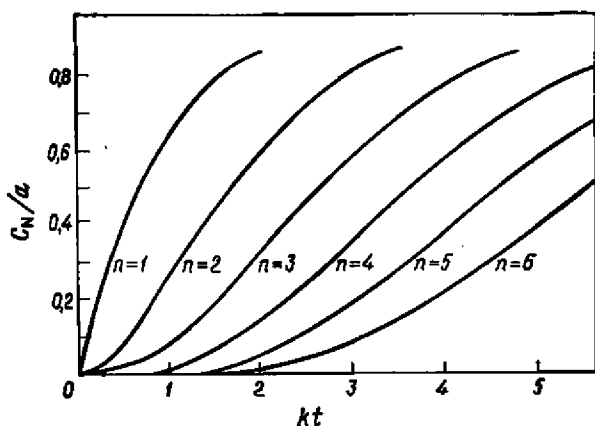


Рис. 8.7. Зависимость C_N/a от kt для $n=1, \dots, 6$ [уравнение (8.2)] [25].

ского решения представлены в табл. 8.8. Достаточно быстро можно получить решение этого уравнения при помощи метода Ньютона — Рафсона, причем получается решение в форме, удобной для практического использования. Вот допустимое приближительное общее решение

$$\tau_n \approx [(n-1) + \ln 2]/k. \quad (8.4)$$

Можно также вычислить значение индукционного периода, упомянутого выше. Путем подстановки выбранных величин C_N/a и n в программу ЭВМ найдены значения kt (табл. 8.9). В соответствии с ожиданиями при постоянном n наблюдается уменьшение kt при увеличении отношения C_N/a и увеличение kt при росте n и постоянстве C_N/a . Интересно, что при росте n разность между kt и C_N/a для крайних случаев уменьшается. Замена однотоечно связанного лиганда на двухточечный приводит к более значительному эффекту, чем, например, изменение n от 5 до 10.

Из экспериментальных результатов можно рассчитать константу скорости десорбции. При рН 8 и комнатной температуре она равна $0,25 \cdot 10^{-4}$ мин⁻¹. Это значение, а также данные табл. 8.9

Таблица 8.8

Результаты решения уравнения (8.3)
для n от 1 до 6

n	$k\tau_n$
1	0,69
2	1,68
3	2,67
4	3,67
5	4,67
6	5,67

позволяют сделать вывод, что через 2—3 с концентрация молекул свободного лиганда во влажном геле составит 2 пмоль/мл при первоначальном однотоочечном связывании 2 мкмоль/мл. Порядок экспериментальной константы скорости десорбции согласуется с величинами, найденными ранее. При постоянном значении k упомянутое выше время 2—3 с превращается в

1 ч ($n=2$), 5 дней ($n=5$) и 5—6 недель ($n=10$). Эта тенденция согласуется с наблюдениями Вильчека [89].

Тени [76] вывел, что времена половинной десорбции и временную зависимость количеств освобожденного лиганда можно удобно рассчитать из табличных значений χ^2 , пользуясь хорошо известными соотношениями между кумулятивной вероятностной функцией распределения Пуассона и распределением χ^2 .

Грибно и Тессер [25] предложили уравнение десорбции: их вывод основан на четырех основных предположениях: а) при $t=0$ все молекулы лиганда присоединены к матрице максимальным числом связей n ; б) разрыв связей лиганд—матрица протекает с кинетикой псевдопервого порядка (принимается, что концентрация гидроксил-ионов в буферном растворе постоянна); в) прочность всех связей лиганд—матрица одинакова, и их разрыв характеризуется одинаковым значением константы скорости k ; г) разрыв связей происходит последовательно, т. е. данная нумерация связей подразумевает, что связь 2 будет атаковаться группой OH^- , только если связь 1 уже разорвалась, и т. д.

Оставив в силе первые три допущения (а—в), можно предположить неупорядоченную нуклеофильную атаку гидроксильны-

Таблица 8.9

Значения kt при разных n и C_N/a (расчет на ЭВМ)

n	C_N/a					
	$\cdot 10^{-2}$	$\cdot 10^{-4}$	$\cdot 10^{-6}$	$\cdot 10^{-8}$	$\cdot 10^{-10}$	$\cdot 10^{-12}$
1	$0,10 \cdot 10^{-1}$	$0,10 \cdot 10^{-3}$	$0,10 \cdot 10^{-5}$	$0,10 \cdot 10^{-7}$	$0,10 \cdot 10^{-9}$	$0,10 \cdot 10^{-11}$
2	$0,15 \cdot 10^0$	$0,14 \cdot 10^{-1}$	$0,14 \cdot 10^{-2}$	$0,14 \cdot 10^{-3}$	$0,14 \cdot 10^{-4}$	$0,14 \cdot 10^{-5}$
5	$0,13 \cdot 10^1$	$0,44 \cdot 10^0$	$0,17 \cdot 10^0$	$0,66 \cdot 10^{-1}$	$0,26 \cdot 10^{-1}$	$0,10 \cdot 10^1$
10	$0,41 \cdot 10^1$	$0,22 \cdot 10^1$	$0,13 \cdot 10^1$	$0,77 \cdot 10^0$	$0,47 \cdot 10^0$	$0,29 \cdot 10^0$

ми ионами. Это эквивалентно предположению, что порядок разрыва связей лиганд — матрица не зависит от нумерации [39].

Если a — общая концентрация лиганда (мкмоль/мл), а s — число гидролизующихся связей, то

$$a = c_n + c_{n-1} + c_{n-2} + \dots + c_{n-s} + \dots + c_0,$$

где c_0 — концентрация свободного лиганда. Число различных форм лиганда с s расщепленными связями составляет $\binom{n}{s} = n!s! \times \times (n-s)!$. Эти $\binom{n}{s}$ формы кинетически вырождены вследствие допущения (в), т. е. вероятность атаки любой из $(n-s)$ остающихся связей на следующей стадии та же, что и на предыдущей.

При записи дифференциальных уравнений следует учитывать статистические факторы. Если k — константа скорости псевдопервого порядка, пропорциональная вероятности разрыва данной связи в течение определенного времени, то вероятность того, что любая связь лиганда, имеющего n точек связывания, будет разорвана, пропорциональна nk . Статистический фактор для лигандов с $(n-1)$ точками связывания равен $(n-1)!$ и т. д.

Можно записать следующее:

$$dc_n/dt = -nkc_n,$$

$$dc_{n-1}/dt = nkc_n - (n-1)kc_{n-1},$$

$$dc_{n-2}/dt = (n-1)kc_{n-1} - (n-2)kc_{n-2}$$

и т. д. Решение этих дифференциальных уравнений легко найти по методу Бернулли или Лагранжа

$$c_n = a \exp(-nkt),$$

$$c_{n-1} = na \{ \exp[-(n-1)kt] - \exp(-nkt) \},$$

$$c_{n-2} = n(n-1)(a/2) \{ \exp[-(n-2)kt] - 2 \exp[-(n-1)kt] + \exp(-nkt) \},$$

$$c_{n-s} = \binom{n}{s} a \sum_{r=0}^s \binom{s}{r} (-1)^{s-r} \exp[-(n-r)kt]. \quad (8.5)$$

Откуда следует уравнение десорбции

$$c_0/a = 1 - \sum_{s=0}^{n-1} \sum_{r=0}^s \binom{n}{s} \binom{s}{r} (-1)^{s-r} \exp[-(n-r)kt]. \quad (8.6)$$

Это уравнение можно переписать в виде

$$c_0/a = 1 - \sum_{s=1}^n \binom{n}{s} (-1)^{s-1} \exp(-skt). \quad (8.7)$$

Таблица 8.10

Время половинной десорбции τ_n , рассчитанное по уравнению (8.8),
для $k=2,5 \cdot 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$

n	τ_n , сут	
	Модель, предполагающая последовательные реакции	Модель, предполагающая неупорядоченные реакции
1	19,16	19,16
2	46,67	34,17
3	74,67	43,89
4	101,94	51,11
5	129,72	56,67
6	157,50	61,67

■ k найдена экспериментально [25].

k — экспериментальный измеряемый параметр, поэтому время половинной десорбции τ_n можно вычислить из

$$1/2 = \sum_{s=1}^n \binom{n}{s} (-1)^{s-1} \exp(-sk\tau_n). \quad (8.8)$$

Зависимость освобождения лиганда от времени вычисляется из уравнения (8.7). Форма получаемых кривых качественно та же, что и в модели Грибно и Тессера [25], хотя аналитически уравнение десорбции отличается [ср. уравнение (8.7)].

Рассчитанные по уравнению (8.8) итеративным методом Ньютона — Рафсона значения $k\tau_n$ сопоставлены с полученными Грибно и Тессером [25] (табл. 8.10). Заметно, что $k\tau_n$ с возрастанием n увеличиваются более плавно, чем в модели Грибно и Тессера. Объяснение этого неожиданного результата состоит в том, что устойчивость, приобретаемая благодаря дополнительным точкам связывания лиганда, частично компенсируется увеличением вероятности разрыва связи лиганд — матрица. Для $n=1$ обе модели дают одно и то же значение $k\tau_1$. Этому условию удовлетворяет статистическая модель.

8.6. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ, КАСАЮЩИЕСЯ ВЫБОРА СОРБЕНТОВ, ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ГРУПП И МЕТОДОВ СВЯЗЫВАНИЯ И БЛОКИРОВАНИЯ

Как уже упоминалось в вводной части этой главы, при выборе носителя во внимание следует принимать не только свойства, вытекающие из самой сути аффинной хроматографии или природы иммобилизованных ферментов, но также и сферу использования этих методов. Другим важным фактором является быстрое расши-

Руководство для

Матрица	Фильтрующие свойства	Десорбция при pH 7,25 °C	Проницаемость для высокомолекулярных веществ
Пористое стекло	Отличные	Незначительная	Очень высокая
Полиакриламид	Хорошие	Низкая	Высокая
Оксалкилмет-акрилатные гели	Отличные	Незначительная	»
Целлюлоза	Прекрасные	Умеренно низкая	Умеренная (переменная)
Сефадекс	Хорошие	Низкая	Умеренная
Агароза	»	Умеренная	Очень высокая
Сшитая глицирином десульфатированная агароза	»	Незначительная	» »
Сшитая глицирином гидроксированная агароза	»	»	То же
Сшитая дивинилсульфоном агароза	Отличные	»	» »

^a Оценка дана в предположении, что первоначальное набухание имело место в водном

^b Гидроксирование полифенолами приводит к продуктам, которые легко окисляются

рение областей применения нерастворимых носителей. Если в настоящее время каким-либо носителем пренебрегают из-за какого-то нежелательного его свойства, он может стать лучше после подходящей модификации. Табл. 8.11 представляет собой как бы руководство для выбора матрицы; она опубликована Поратом и Кристиансенем [57]. Из таблицы, например, хорошо видно, что сшивание дивинилсульфоном значительно улучшает фильтрующие свойства агарозы. Специфические сорбенты, поставляемые в 1976 г. фирмой Pharmacia, уже приготовлены из сефарозы CL, т. е. из агарозы, сшитой 2,3-дибромпропанолом и десульфированной щелочным гидролизом в восстановительных условиях. Кроме того, например, в случае октил- или фенил-сефарозы CL-4B октильная и фенильная группы связаны с моносахаридным звеном матрицы агарозы через незаряженные, химически устойчивые эфирные связи. Эти сорбенты, несомненно с хорошими фильтрующими свойствами, с отличной проницаемостью и минимальной неспецифической адсорбцией, могут применяться без риска их разрушения или отщепления аффинного лиганда. Они химически стабильны при pH 3—14, могут быть автоклавированы при 120 °C

Таблица 8.11

выбора матрицы

Неспецифическая адсорбционная емкость	Химическая устойчивость		Набухаемость в органических растворителях	Плотность вводимых реакционноспособ- ных групп
	pH>12	pH<3		
Очень высокая	Очень низкая	Очень высокая (кроме HF)	—	Низкая
Низкая	Низкая	Умеренная	?	Высокая
»	Очень высокая	Очень высокая	—	Умеренная
Умеренная — высокая	То же	Умеренная	Плохая	Высокая
Низкая	» »	»	»	»
»	» »	Низкая	Хорошая	Умеренная
Очень низкая	» »	Умеренная	Очень хоро- шая ^a	»
То же	Низкая ^b	»	»	Высокая
» »	»	»	»	Умеренная

^a в растворе.
при высоких pH.

и pH 7, и с ними можно работать в органических растворителях. Однако вопрос их практического использования в больших масштабах не решен еще с экономической точки зрения. Напротив, разработка таких носителей, как стекло и керамические материалы, более целесообразна именно для практического использования. К их недостаткам относятся относительно высокая неспецифическая сорбция, а также чувствительность к щелочному гидролизу. Однако соответствующая модификация или обработка поверхности в значительной степени позволяет преодолеть эти недостатки. Ввиду того что целлюлоза является одним из наиболее дешевых носителей, она большей частью используется экспериментаторами, интересующимися практическими приложениями. Ее недостатком является то, что она часто обнаруживает значительную неспецифическую сорбцию и слабую проницаемость раствора через матрицу, что не легко поддается управлению [57]. Биоспецифические сорбенты, основанные на целлюлозе, в отличие от других сорбентов очень часто обнаруживают отклонение от поведения, ожидаемого на основании степени замещения. Следовательно, замещения затрагивают, очевидно, участки, простран-

ственно недоступные для образования комплексов с макромолекулами. Относительно плохие фильтрующие свойства можно улучшить, соответствующим образом модифицировав матрицу или приготовив смесь с инертным нерастворимым носителем, например с таким, как стеклянные шарики. Хотя целлюлоза может атаковаться бактериями или грибами, при создании определенных условий она проявляет значительную устойчивость.

В табл. 8.11 отсутствует сополимер этилена с малеиновым ангидридом, потому что из-за высокого содержания карбоксильных групп он постепенно все реже используется в аффинной хроматографии, а также для получения иммобилизованных ферментов, как это следует из табл. 11.1. Из табл. 11.1 также ясно видно, что столь же относительно редко используются полиакриламидные гели. Они действительно обладают рядом хороших свойств, но их устойчивость в щелочной среде плохая. При щелочном гидролизе и в сильно кислых средах образуются свободные карбоксильные группы. По-видимому, имеются очень хорошие перспективы для применения оксикалкетакрилатных гелей; их производство все еще не развито в полной мере, однако с ними накоплен ценный опыт. Использование декстрановых гелей уменьшилось в связи с расширением применения гелей агарозы (за исключением некоторых специальных случаев); в настоящее время гели агарозы являются наиболее широко применяемыми, как об этом можно судить по данным табл. 11.1. Поэтому в этой главе им уделено большое внимание.

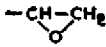
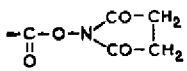
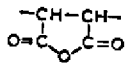
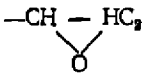
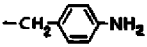
Высокая проницаемость нерастворимых носителей, которая является предпосылкой легкости образования специфических комплексов высокомолекулярных соединений, не является достаточным условием для пространственной доступности участков связывания. Для низкомолекулярных аффинных лигандов в особенности необходимо ввести пространственные группы между этими лигандами и поверхностью матрицы. Природе этих пространственных групп уже уделено много внимания.

Гидрофобные свойства первых использованных пространственных групп послужили причиной возникновения нового типа хроматографии, а именно гидрофобной хроматографии, которая далее развивалась как самостоятельный метод. В этом методе важную роль играет гидрофобная пространственная группа. Однако если в аффинной хроматографии делаются попытки использовать преимущественно специфические взаимодействия участков связывания, например фермента и ингибитора, то предпочтение отдается пространственным группам гидрофильного характера. Поскольку роль аффинной хроматографии в исследованиях специфических взаимодействий и механизма действия биологически активных веществ возрастает, в настоящее время обязательным является соответствие взаимодействия изучаемого вещества с иммобилизо-

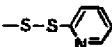
ванным аффинным лигандом таковому в растворе. В этих случаях желательно исключить влияние и природы носителя, и процесса иммобилизации. Однако иммобилизация позволяет изучить влияние микроокружения. Очень часто новое окружение благоприятно влияет на свойства иммобилизованного вещества. Среди многих изменений свойств первым следует отметить повышение устойчивости некоторых иммобилизованных ферментов. Зависимость устойчивости от типа связывания и природы носителя показана Витоллом и Месоном [84]. Был приготовлен ряд иммобилизованных папаинов, связанных различным образом со стеклом, и определялось время, в течение которого активность препаратов уменьшается наполовину. Если папаин связан с аминопроизводным стекла с помощью карбодимида, время половинной потери активности в рабочем режиме составляет 1,9 сут, а для иммобилизации при помощи глутарового альдегида оно равно 2,2 сут; фермент, связанный с карбоксильным производным стекла через амидную связь, имеет время половинной потери активности 4,1 сут, связанный с ариламинным производным стекла — 7,2 сут, а со стеклом, покрытым двуокисью циркония, связанный амидной связью имеет самое высокое время — 35 сут.

Из вышеизложенного следует, что кроме природы нерастворимого носителя существенную роль играет также метод связывания. В табл. 8.12 дан обзор методов связывания, рассмотренных в разд. 8.2 и 8.3. При выборе методов связывания главное внимание уделяется тому, какие группы аффинного лиганда можно использовать для присоединения к нерастворимой матрице без затрагивания связывающих участков аффинных лигандов. Если доступно несколько групп, рекомендуется выбрать наиболее избирательный метод, потому что желательна специфическая связь через одну определенную функциональную группу. Присоединение не должно приводить к появлению в специфическом сорбенте неспецифически сорбирующих групп. Поэтому лучше привязывать к аффинному лиганду пространственную группу и только модифицированный таким образом лиганд присоединять к нерастворимому носителю. В результате образования связи между поверхностью нерастворимого носителя и аффинным лигандом не должно возникать ни в носителе, ни в аффинном лиганде неспецифически сорбирующих групп; эта связь должна быть устойчивой в ходе сорбции, десорбции и регенерации (см. разд. 8.5). При выборе метода необходимо принимать во внимание также зависимость устойчивости аффинного лиганда от pH. Кислые протеиназы, например, нельзя связывать в щелочных средах, поскольку они будут при этом инактивироваться. Поэтому в табл. 8.12 приводится также значение pH, при котором проводится связывание. Однако во многих методах могут быть получены хорошие результаты даже при низких pH (связывание в нейтральной среде на

Обзор методов связывания, включенных в гл. 8

Группа на аффинном лиганде	pH реакции связывания	Группа на нерастворимой матрице	Активирующий реагент	Раздел, где упоминается метод
—NH ₂ —NH ₂ —NH ₂	7,5—8 4,5—6,0 8,7	—CO—NH—NH ₂ —COOH —OH	NaNO ₂ + HCl Карбодимид 2-Амино-4,6-дихлор-симм-триазин	8.2.1, 8.2.6 8.2.1, 8.3 8.2.1
—NH ₂ —NH ₂	8,5 8	—OH —OH	Бромацетил Окисление NaIO ₄	8.2.1 8.2.3
—NH ₂ —NH ₂	8—10 (можно ≥6) 8,5—13	—OH 	BrCN —	8.2.4 8.2.4
—NH ₂	5—10		—	8.2.4
—NH ₂	8—10	—OH	Бензохион	8.2.4
—NH ₂	7—5		—	8.2.5
—NH ₂	8—5	—CO—NH—  —NH ₂	Cl ₂ C=S	8.2.6, 8.2.8
—NH ₂	7,7	—NH ₂	Глутаровый альдегид	8.2.6
—NH ₂	9—12	—CO—O—  —NO ₂	—	8.2.7
—COOH —COOH —OH	4,5—6 4,5—6 Щелочной раствор	—NH ₂ —SH —NH ₂	Карбодимид » Окисление NaIO ₄	8.2.8, 8.3 8.2.4, 8.3 8.2.1
—OH	9—13		—	8.2.4
	7,5—8,5	—CH ₂ —  —NH ₂	NaNO ₂ + HCl	8.2.1, 8.2.2, 8.2.6

Продолжение табл. 8.12

Группа ни аффинном лиганде	pH реакции связывания	Группа на нерастворимой матрице	Активирующий реагент	Раздел, где упоминается метод
-SH	9—13		—	8.2.4
-SH	Широкий диа- пазон усло- вий		—	8.2.4
-SH	4,5—6,0	-COOH	Карбодиимид	8.2.4, 8.3
	Щелочной рас- твор	-NH ₂	—	8.2.3

агарозе после активации бромцианом или с помощью глутарового альдегида в кислой среде). В этих случаях необходимо в обычную методику внести соответствующие изменения. Когда реакция присоединения закончена, следует блокировать непрореагировавшие группы (разд. 8.4).

При использовании для связывания бифункциональных реагентов следует помнить о возможных осложнениях, возникающих в результате сшивания и носителя, и белков, а также их друг с другом, поэтому во время связывания следует тщательно поддерживать необходимые условия реакции (pH, температуру и продолжительность реакции).

Для связывания белков наиболее часто используют такие группы молекулы белка, как N-концевая α -аминогруппа и ϵ -аминогруппа лизина, а также C-концевая карбоксильная группа и карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислот. Фенольные гидроксильные группы тирозина или SH-группы остатков цистеина могут также принимать участие в связывании. В углеводах и их производных чаще всего в связывании принимают участие гидроксильные и аминогруппы, в нуклеиновых кислотах — фосфатные группы, гидроксильные группы сахара и амино- или енольные группы оснований. Высокомолекулярные соединения, которые обладают большим числом групп, способных связываться, присоединяются несколькими участками. Вследствие этого значительно уменьшается риск отщепления связанной молекулы, однако многоточечное связывание может приводить к деформации нативной структуры иммобилизованной молекулы и таким образом изменять ее свойства. Иногда применяют методы более лабильного связывания, например через тиолсложноэфир-

ную связь между тиольными производными нерастворимых носителей и молекулами, содержащими карбоксильные группы и наоборот. Такие связи могут быть специфически расщеплены гидроксиламиноом, который приводит к отделению интактного комплекса аффинного лиганда и вещества, подлежащего выделению с матрицы.

С точки зрения легкости отщепления связывание белков через S—S-мостики, по-видимому, имеет преимущества главным образом при получении иммобилизованных ферментов. Инактивированные молекулы фермента можно удалить путем восстановления и носитель использовать после активации для связывания нового активного фермента. Поскольку относительно мало ферментов содержат свободные SH-группы, последние можно ввести в молекулу тиолированием (разд. 8.2.4). В противоположность этому для сорбентов, приготовленных из стабильных низкомолекулярных соединений, предпочтительнее использовать прочные связи (например, связывание с эпоксиактивированными гелями), потому что их активность может быть регенерирована промывкой с денатурирующими реагентами, такими, как 6 М гуанидинхлорид (разд. 10.3). Прочная связь образуется также между альдегидами и аминоклупами, если шиффово основание стабилизировать восстановлением борогидридом натрия. Присоединение аффинных лигандов к носителям, которые содержат активные сложноэфирные группы, также ведет к прочной связи. Однако при этом образуются также свободные карбоксильные группы, влияние которых необходимо исключить, что достигается повышением ионной силы раствора при аффинной хроматографии. К недостаткам специфических сорбентов, приготовленных азосочетанием, относится их невысокая стабильность, требуемая для иммобилизованных белков [57]. Причина низкой стабильности заключается, вероятно, в том, что связь образуется не только с фенольным и имидазольным кольцами остатков тирозина и гистидина, но также и с α -концевой и ϵ -аминогруппами. Эти побочные реакции приводят к образованию триазеновых связей ($—N=N—NH—$), которые менее стабильны и легко гидролизуются. Аффинные лиганды, связанные азосвязью, можно освободить с помощью дитионита натрия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Axén R., Ernback S., Eur. J. Biochem., 18, 351—360 (1971).
2. Axén R., Porath J., Ernback S., Nature (London), 214, 1302—1304 (1967).
3. Barry S., Griffin T., O'Carra P., Biochem. Soc. Trans., 2, 1319—1322 (1974).
4. Barry S., O'Carra P., Biochem. J., 135, 595—607 (1973).
5. Brandt J., Andersson L. O., Porath J., Biochim. Biophys. Acta, 386, 196—202 (1975).
6. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M., Biochem. J., 133, 573—584 (1973).

7. Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 37, 575—578 (1951).
8. Carlsson J., Axén R., Unge T., Eur. J. Biochem., 59, 567—572 (1975).
9. Čoupek J., Kriváková M., Pokorný S., J. Polym. Sci. Symp., 42, 185—190 (1973).
10. Čoupek J., Labský J., Kádal J., Turková J., Valentová O., Biochim. Biophys. Acta, 481, 289—296 (1977).
11. Crook E. M., Brocklehurst K., Wharton C. W., Methods Enzymol., 19, 963—978 (1970).
12. Cuatrecasas P., J. Biol. Chem., 245, 3059—3065 (1970).
13. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., Methods Enzymol., 22, 345—378 (1971).
14. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., Annu. Rev. Biochem., 40, 259—275 (1971).
15. Cuatrecasas P., Parikh I., Biochemistry, 11, 2291—2299 (1972).
16. De Larco J., Guroff G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 486—492 (1973).
17. Fransson L. Å., Biochim. Biophys. Acta, 437, 106—115 (1976).
18. Fritz H., Brey B., Béress L., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 19—30 (1972).
19. Fritz H., Brey B., Schmal A., Werle E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 350, 617—625 (1969).
20. Fritz H., Hochstrasser K., Werle E., Brey E., Gebhardt B. M., Z. Anal. Chem., 243, 452—463 (1968).
21. Fritz H., Schult H., Hutzel M., Wiedemann M., Werle E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 308—312 (1967).
22. Gilham P. T., Methods Enzymol., 21, 191—197 (1971).
23. Goldstein L., Methods Enzymol., 19, 935—962 (1970).
24. Goldstein L., Katchalski E., Anal. Chem., 243, 375—396 (1968).
25. Gribnau T. C. J., Tesser G. I., Experientia, 30, 1228—1230 (1974).
26. Gundlach G., Köhne C., Turba F., Biochem. Z., 336, 215—228 (1962).
27. Hierowski M., Brodersen R., Biochim. Biophys. Acta, 354, 121—129 (1974).
28. Hochstrasser K., Relchert R., Schwarz S., Schwarz S., Werle E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 221—226 (1972).
29. Hornby W. E., Lilly M. D., Crook E. M., Biochem. J., 98, 420—425 (1966).
30. Inman J. K., Dintzis H. M., Biochemistry, 8, 4074—4082 (1969).
31. Jagendorf A. T., Patchornik A., Sela M. P., Biochim. Biophys. Acta, 78, 516—528 (1963).
32. Kanfer J. N., Petrovich G., Mumford R. A., Anal. Biochem., 55, 301—305 (1973).
33. Kay G., Lilly M. D., Biochim. Biophys. Acta, 198, 276—285 (1970).
34. Kristiansen T., Biochim. Biophys. Acta, 382, 567—574 (1974).
35. Laas T., J. Chromatogr., 66, 347—355 (1972).
36. Laas T., J. Chromatogr., 111, 373—387 (1975).
37. Lamed R., Levin Y., Oplatka A., Biochim. Biophys. Acta, 305, 163—171 (1973).
38. Larsson P. O., Mosbach K., Biotechnol. Bioeng., 13, 393—398 (1971).
39. Lasch J., Experientia, 31, 1125—1126 (1975).
40. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E., Biochemistry, 3, 1905—1913 (1964).
41. Lowe C. H., Dean P. D. G., Affinity Chromatography, Wiley, New York, London, 1974, p. 272.
42. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 347—351 (1974).
43. Ludens J. H., De Vries J. R., Fanestil D. D., J. Biol. Chem., 247, 7533—7538 (1972).
44. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P., Advan. Exp. Med. Biol., 42, 3—14 (1974).

45. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P., *Anal. Biochem.*, **60**, 149—152 (1974).
46. *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, R. A. Messing (Ed.), Academic Press, New York, 1975, p. 232.
47. Micheel F., Ewers J., *Makromol. Chem.*, **3**, 200—209 (1949).
48. Morikawa Y., Tezuka T., Teranishi M., Kimura K., Fujimoto Y., Samajima H., *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1137—1174 (1976).
49. Nishikawa A. H., Bailon P., *Anal. Biochem.*, **64**, 268—275 (1975).
50. Nishikawa A. H., Bailon P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 576—584 (1975).
51. O'Carra P., Barry S., Griffin T., *FEBS Lett.*, **43**, 169—175 (1974).
52. Parikh I., Sica V., Nola E., Puca G. A., Cuatrecasas P., *Methods Enzymol.*, **34**, 670—688 (1974).
53. Porath J., *Methods Enzymol.*, **34**, 13—30 (1974).
54. Porath J., Aspberg K., Drevin H., Axén R., *J. Chromatogr.*, **86**, 53—56 (1973).
55. Porath J., Axén R., Ernback S., *Nature (London)*, **215**, 1491—1492 (1967).
56. Porath J., Janson J. C., Låas T., *Chromatogr.*, **60**, 167—177 (1971).
57. Porath J., Kristiansen T., in: *The Proteins*, H. Naurath, R. L. Hill (Eds.), Academic Press, New York, 3rd edn., 1975, pp. 95—178.
58. Porath J., Låas T., Janson J. C., *Chromatogr.*, **103**, 49—62 (1975).
59. Rafestin M. E., Obrenovitch A., Oblin A., Monsigny M., *FEBS Lett.*, **40**, 62—66 (1974).
60. Ratner D., *J. Mol. Biol.*, **88**, 373—383 (1974).
61. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 28—35 (1972).
62. Roche A. C., Schauer R., Monsigny M., *FEBS Lett.*, **57**, 245—249 (1975).
63. Sanderson C. J., Wilson D. V., *Immunology*, **20**, 1061—1065 (1971).
64. Sato T., Mori T., Tosa T., Chibata I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 788—796 (1971).
65. Schnapp J., Shalit Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 8—14 (1976).
66. Sica V., Parikh I., Nola E., Puca G. A., Cuatrecasas P., *J. Biol. Chem.*, **248**, 6543—6558 (1973).
67. Silman I. H., Katchalski E., *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 873—908 (1966).
68. Smith B. R., *J. Endocrinol.*, **52**, 229—237 (1972).
69. Sundberg L., Höglund S., *FEBS Lett.*, **37**, 70—73 (1973).
70. Sundberg L., Kristiansen T., *FEBS Lett.*, **22**, 175—177 (1972).
71. Sundberg L., Porath J., *J. Chromatogr.*, **90**, 87—98 (1974).
72. Svensson B., *FEBS Lett.*, **29**, 167—169 (1973).
73. Tabachnik M., Sobotka H., *J. Biol. Chem.*, **235**, 1051—1054 (1960).
74. Tesser G. I., Fisch H.-U., Schwyzer R., *FEBS Lett.*, **23**, 56—58 (1972).
75. Tesser G. I., Fisch H.-U., Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 1718—1730 (1974).
76. Thöni H., *Experientia*, **31**, 251 (1975).
77. Turková J., *Methods Enzymol.*, **44**, 66—83 (1977).
78. Turková J., Bláha K., Malaniková M., Vancurová D., Švec F., Kádal J., *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 162—169 (1978).
79. Turková J., Bláha K., Valentová O., Čoupek J., Seifertová A., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 586—593 (1976).
80. Turková J., Hubálková O., Kriváková M., Čoupek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 1—9 (1973).
81. Vaquellin G., Lacombe M. L., Hanoune J., Strosberg A. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **64**, 1076—1082 (1975).
82. Weetall H. H., *Sep. Purif. Methods*, **2**, 199—229 (1973).
83. Weetall H. H., Filbert A. M., *Methods Enzymol.*, **34**, 59—72 (1974).
84. Weetall H. H., Mason R. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 455—466 (1973).

85. *Weliky N., Weetall H. H., Gilden R. V., Campbell D. H.*, *Immunochemistry*, **1**, 219—229 (1964).
86. *Weston P. D., Aurameas S.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 1574—1580 (1971).
87. *Whiteley J. M., Jerkunica I., Deits T.*, *Biochemistry*, **13**, 2044—2050 (1974).
88. *Wichlerle O., Lim D.*, *Nature (London)*, **185**, 117—118 (1960).
89. *Wilchek M.*, *FEBS Lett.*, **33**, 70—72 (1973).
90. *Wilchek M.*, *Advan. Exp. Med. Biol.*, **42**, 15—31 (1974).
91. *Wilchek M., Miron T.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 72—76 (1974).
92. *Wilchek M., Miron T.*, *Mol. Cell. Biochem.*, **4**, 181—187 (1974).
93. *Wilchek M., Oka T., Topper Y. J.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **72**, 1055—1058 (1975).
94. *Wolodko W. T., Kay C. M.*, *Can. J. Biochem.*, **53**, 175—188 (1975).
95. *Yong M. S.*, *Science*, **182**, 157—158 (1973).
96. *Affinity Chromatography, principles and methods*, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

Характеристика носителей и иммобилизованных аффинных лигандов

Для успешного применения метода аффинной хроматографии необходимо иметь представления о свойствах как нерастворимых носителей, так и иммобилизованных аффинных лигандов. Одними из основных свойств, определяющих возможность использования нерастворимых носителей для целей аффинной хроматографии, являются сорбционные. В разд. 9.1 приведены некоторые примеры методик для определения неспецифической сорбции. Для связывания аффинного лиганда важно количество активируемых или активных групп, способных присоединить молекулы аффинного лиганда. В разд. 9.2 описаны методы определения карбоксильных, аминных и гидразидных групп и цветная реакция с 2,4,6-тринитробензолсульфонатом натрия, а также методы определения оксирановых групп, *п*-нитрофениловых эфиров и винильных и сульфгидрильных групп. Число групп, которые могут быть использованы для иммобилизации, часто оценивается на основе данных о присоединении низкомолекулярных веществ, например глицина или глициллейцина, к эпоксиактивированным гелям. Некоторые методы определения содержания этих веществ описаны в разд. 9.3. Из табл. 8.1, в которой приведены количества глицина и химотрипсина, присоединенных к различным типам сферона, видно, как важно принимать во внимание размер иммобилизуемых молекул и площадь поверхности нерастворимого носителя.

Наиболее общие из применяемых методов определения содержания иммобилизованных аффинных лигандов перечислены в разд. 9.3. Среди них, например, спектроскопические методы, кислотно-основное титрование, определение аффинных лигандов после их отщепления кислотным, щелочным или ферментативным гидролизом, элементный анализ, а также радиометрические методы.

Для иммобилизованных ферментов наряду с определением содержания связанного белка, общей или относительной активности дополнительную ценную информацию может дать также титрование активных центров. Примеры приведены в разд. 9.4. Некоторые методики для наблюдения за конформационными изменениями даны в разд. 9.5, а методы исследования распределения белков, связанных на поверхности нерастворимого носителя, — в разд. 9.6.

Особенно подробное изучение иммобилизованных аффинных лигандов необходимо главным образом в тех случаях, когда аф-

финная хроматография и иммобилизованные ферменты используются при решении таких вопросов, как взаимодействие ферментов и ингибиторов и влияние различного микроокружения на стабильность и каталитические свойства ферментов.

9.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВИРУЕМЫХ И АКТИВНЫХ ГРУПП

Неспецифическая сорбция является осложняющим фактором в аффинной хроматографии. Это уже неоднократно подчеркивалось и детально рассматривается в разд. 10.3. Например, в агаре — одном из наиболее часто используемых носителей — как отмечают Порат и др. [55], два типа групп ответственны за сорбцию, а именно моносультатные эфирные и карбонильные группы.

9.1.1. Определение адсорбционной емкости

0,1%-ный раствор цитохрома с в 0,01 М ацетате аммония при pH 4,1 наносят на колонку ($3 \times 0,5$ см) с гелем, уравновешенную тем же буфером до насыщения; затем колонку промывают, пока в элюате не перестанет обнаруживаться белок. Адсорбированный цитохром снимают 0,15 М ацетатом аммония (pH 4,1) и определяют количество десорбированного цитохрома, измеряя оптическую плотность при 280 нм. После каждого определения гель следует отмыть 0,5 М едкого натра, а затем дистиллированной водой до нейтрального pH. Отмытый гель лиофильно высушивают и взвешивают.

В синтетических полимерах, например оксисалкилметакрилатных гелях типа сферона, неспецифическая сорбция может быть обусловлена остающимся незлюорированным органическим растворителем, который использовался при приготовлении сорбента.

Адсорбционную емкость можно определить также другим способом. Раствор сывороточного альбумина в 0,05 М ацетате натрия делят на две равные части. Одну часть наносят на колонку с испытуемым гелем, уравновешенным тем же буфером. После пропускания через колонку фракции, содержащие белок, объединяют и доводят до определенного объема 0,05 М раствором ацетата натрия. Вторую часть раствора альбумина, которая служит в качестве контрольной, доводят до того же объема. Совпадение значений оптической плотности обоих растворов при 280 нм показывает, что неспецифическая сорбция на геле не имеет места. В случае сферона, если сравниваемые растворы не обнаруживают одинакового поглощения, гель следует промыть органическими растворителями, разбавленной кислотой, а затем тщательно дистиллированной водой.

Гели с неспецифической сорбцией не следует использовать для аффинной хроматографии.

9.1.2. Определение остаточных отрицательно заряженных групп [56]

Около 5 г влажного геля промывают на стеклянном фильтре сначала водой, а потом 25 мл 1 М соляной кислоты. Гель после этого отмывают дистиллированной водой до нейтральных pH или отрицательной реакции на хлориды (с нитратом серебра). Навеску геля затем суспендируют в 5 мл 2 М раствора хлорида калия и титруют раствором 0,01 М едкого натра.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВИРУЕМЫХ И АКТИВНЫХ ГРУПП

9.2.1. Определение карбоксильных, гидразидных и аминных групп кислотнo-основным титрованием [37]

9.2.1.1. Определения в расчете на массу сухого образца

Для лучшей воспроизводимости следует относить количество функциональных групп к массе сухого образца геля. Инман [37] рекомендует следующую методику.

Образец на взвешенном стеклянном фильтре промывают с отсасыванием 0,2 М соляной кислотой (для карбоксильных групп) или 0,2 М раствором карбоната натрия (для аминогрупп), чтобы перевести титруемые группы в незаряженную форму. Далее его тщательно промывают дистиллированной водой для полного удаления электролита, а затем — метиловым спиртом для удаления воды. Образец вместе со стеклянным фильтром высушивают в вакууме над безводным хлоридом кальция. Взвешивание следует производить сразу же после того, как фильтр с образцом вынут из эксикатора. Например, полиакриламид увеличивает свою массу на ~2% в 1 ч в результате адсорбции влаги воздуха.

9.2.1.2. Определение карбоксилатных групп [37]

Промытый образец геля суспендируют в 0,2 М растворе хлорида натрия; общий объем суспензии должен быть приблизительно равен двум объемам набухшего геля. pH суспензии доводят до 6,5—7,5 с помощью разбавленного раствора едкого натра. Затем при перемешивании магнитной мешалкой титруют раствором соляной кислоты известной концентрации до pH 2,6. Содержание карбоксильных групп в образце определяют по разности между числом миллиэквивалентов добавленной HCl и свободных H⁺ (0,0025 N). Содержание карбоксильных групп относят к массе сухого образца.

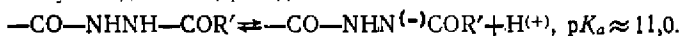
9.2.1.3. Определение гидразидных групп

pK_a ацилгидразидных групп близки к 2,6, и поэтому определение их содержания путем прямого титрования очень затруднительно. Эти группы лучше перевести в сукцинилгидразидные, добавив избыток янтарного ангидрида (0,6 г на 25 мл суспензии) при pH 4,0. Модифицированный гель промывают 0,2 М раствором хлорида натрия и содержание карбоксильных групп определяют по методике, приведенной в разд. 9.2.1.2. Величина плотности гидразидных групп D , полученная из последующего определения сухого веса, относится к сукцинилгидразидному производному с учетом увеличения массы на массу сукцинильных групп. Плотность групп в миллимолях гидразида на 1 г исходного полиакриламида равна $D' = D / (1 - 0,115 D)$.

9.2.1.4. Определение алифатических аминогрупп

Титруемый гель промывают и суспендируют в 0,2 М растворе хлорида калия; объем раствора не должен быть больше удвоенного объема набухшего геля. pH суспензии доводят до 11,0 разбавленным раствором едкого кали. Суспензию титруют раствором соляной кислоты (v) с известной молярностью M , доводя pH до 7 (или при определении α -аминогрупп до pH 6). Затем измеряют объем суспензии (V). Содержание аминогрупп рассчитывают из миллиэквивален-

тов HCl, пошедших на титрование (νM) после вычитания миллиэквивалентов титруемых свободных OH^- . Плотность группы в исходном полиакриламиде D' получают исходя из плотности в расчете на массу высушенного образца производного, используя выражение $D' = D / (1 - D\Delta r)$. Величина Δr может быть вычислена для данного производного и равна 0,001 части молекулярной массы всех атомов остатка, который добавляется в производном к исходной карбамильной боковой цепи. Таким образом, для аминокетильного производного $\Delta r = 0,043$. Этим методом нельзя определять аминогруппы, если в качестве пространственной группа используется диацетилгидразид:



Кориблат и др. [42] определили количество гексаметилендиамина, связанного с сефарозой, титрованием геля по тимолфталенину 0,1 М едким натром.

9.2.2. Определение свободных карбоксильных групп [28]

325 мг хлоргидрата этилового эфира глицина растворяют в 2,5 мл диметилсульфоксида и добавляют эквивалентное количество триэтиламина для перевода эфира в свободное основание. Реакционную смесь, охлаждаемую во льду, перемешивают 1 ч, затем фильтруют для удаления осадка хлорида триэтиламина. Раствор добавляют к 50 мг карбоксильного производного геля. К перемешиваемой на магнитной мешалке суспензии геля добавляют раствор 325 мг дициклогексилкарбодимида в 3 мл диметилсульфоксида и реакцию оставляют при комнатной температуре на 16 ч. Гель отделяют центрифугированием, ресуспендируют в 5 мл диметилсульфоксида и снова центрифугируют. Промывание диметилсульфоксидом повторяют три раза, а затем трижды промывают ацетоном. После высушивания в течение 24 ч над пятиокисью фосфора в вакууме проводят кислотный гидролиз 6 М соляной кислотой в течение 48 ч при 110°C; количество глицина в геле определяют на аминокислотном анализаторе.

9.2.3. Определение свободных аминогрупп в полимерах путем конденсации с 2-окси-1-нафталальдегидом [18]

При конденсации 2-окси-1-нафталальдегида со свободными аминогруппами в полимере образуется стабильный альдимин (шиффово основание). После переноса хромофорной группы с полимера на амин, например бензиламин, определяют содержание образующегося растворимого альдимины. Эско и др. [18] рекомендуют следующую методику.

К 10 мг полимера в абсолютном спирте добавляют с большим (50—100-кратным) избытком 2-окси-1-нафталальдегид и оставляют при комнатной температуре на 12 ч. После тщательной промывки полимера дихлорметаном добавляют 2 мл 0,4 М бензиламина в дихлорметане и смесь вновь оставляют на 30 мин. Содержание 2-окси-1-нафтильденбензиламина определяют спектрофотометрически при 420 нм. Избыток бензиламина не мешает определению.

9.2.4. Определение азидных групп [10]

Свежеприготовленные азидные производные промывают 2—3 раза ледяной водой для удаления кислоты, затем 5—10 мл промытого геля суспендируют в 20 мл 0,1 М едкого натра и 2 ч перемешивают при комнатной температуре. 0,1 мл прозрачного супернатанта добавляют к 4,9 мл 0,1 М раствора аммонийных квасцов. Измеряют оптическую плотность при 458,1 нм относительно контрольного образца (4,9 мл 0,1 М раствора железосаммониевых квасцов + 0,1 мл

0,1 М едкого натра); измерения следует выполнять в течение первых 5 мин, потому что в кислой среде медленно освобождается азотистоводородная кислота. При концентрации азида 0,01—1,4 ммоль/л применим закон Бера ($\epsilon_{458,1} = 1,2 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹). Концентрация азидов в супернатанте (в миллиэквивалентах на литр) может быть рассчитана по уравнению

$$[N_3^-] = \frac{A}{1,2} \cdot \frac{5}{0,1} \quad (9.1)$$

Концентрация азидов в образце сухого полимера (в миллиэквивалентах на грамм) равна

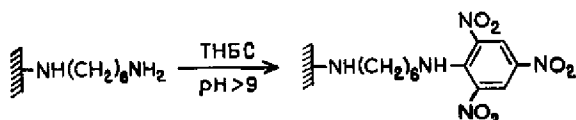
$$[N_3^-]_c = [N_3^-] \cdot b \cdot \frac{1}{c}, \quad (9.2)$$

где b — общее содержание воды в суспензии в литрах, а c — масса сухого образца полимера в граммах.

9.2.5. Цветная реакция с 2,4,6-тринитробензолсульфонатом натрия

Инман и Динтзис [38] описали простую качественную цветную реакцию, с помощью которой можно следить за процессом замещения в геле.

К 0,2—0,5 мл модифицированного геля (в дистиллированной воде) в ~1 мл насыщенного раствора буры прибавляют 3 капли 3%-ного раствора 2,4,6-тринитробензолсульфоната (ТНБС):



Оставляют раствор на 2 ч при комнатной температуре (для развития окраски). В табл. 9.1 указаны цвета, получающиеся при исследовании некоторых производных геля. Увеличение замещения аминопроизводных карбоксильными лигандами или гидразидных производных аффинными лигандами, которые содержат аминогруппы, может быть определено по относительной интенсивности окраски геля. Количественные результаты можно получить, если отмыть гель от пикри-

Таблица 9.1

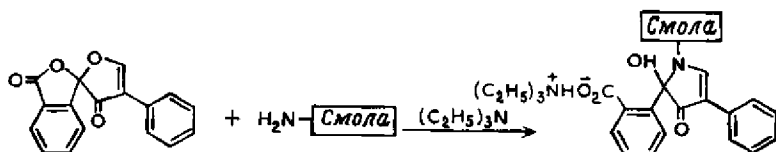
Окраска, образующаяся в результате реакции геля с 2,4,6-тринитробензолсульфонатом натрия

Производное геля	Цвет
Незамещенная агароза или полиакриламид	Палесо-желтая
Карбоксильное и бромацетильное	Желтая
Первичные алифатические амины	Оранжевая
Первичные ароматические амины	Красно-оранжевая
Незамещенные гидразиды	Темно-красная

новой кислоты и непрореагировавшего ТНБС, а затем солилилизировать его нагреванием в 50%-ной уксусной кислоте. Содержание аминогрупп в геле определяют, измеряя оптическую плотность при 340 нм.

9.2.6. Флуорескаминный метод быстрого определения следовых количеств аминогрупп [21]

Флуорескамин — очень чувствительный флуорогенный реагент, способный почти мгновенно реагировать с первичными аминосоединениями; при этом образуются флуорофоры, характеризующиеся максимумами поглощения и излучения соответственно при 390 и 475 нм. Реагент позволяет обнаружить пикомольные количества первичных аминов, он реагирует с незамещенными аминогруппами нерастворимого носителя в мягких условиях с образованием сильно флуоресцирующих производных:

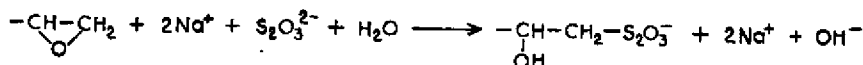


5—10 мг анализируемого геля переносят на стеклянный фильтр и промывают дихлорметаном, спиртом, снова дихлорметаном и хлороформом (каждым растворителем три раза). Гель затем обрабатывают 10%-ным триэтиламином в хлороформе, промывают хлороформом, спиртом и снова хлороформом (каждым растворителем четыре раза по 1 мл). После фильтрования с отсасыванием гель насыщают несколькими каплями 10%-ного триэтиламина в хлороформе. Затем добавляют раствор флуорескамина (10 мг/мл). Триэтиламин должен присутствовать в геле перед добавлением флуорескамина для предотвращения превращения производного геля, содержащего флуорофор, в нефлуоресцирующий γ -лактон. Подготовленный раствор оставляют на 10 мин при комнатной температуре, затем гель фильтруют с отсасыванием и промывают хлороформом, метанолом и снова хлороформом.

Воронку, содержащую гель, облучают ближним ультрафиолетовым светом (366 нм) и сравнивают флуоресценцию с контрольным образцом. Если замещение близко к полному, интенсивность флуоресценции очень низка и близка к контрольной. Результаты воспроизводятся с раствором флуорескамина, который хранился 1 месяц при 4°C.

9.2.7. Определение оксиановых групп [63]

Для определения содержания оксиановых групп в растворе и в геле агарозы используют реакцию между оксиановым кольцом и тиосульфатом натрия



Выделяющуюся щелочь титруют 0,1 М соляной кислотой на рН-стате. Для определения оксирановых групп в растворе Санберг и Порат [63] рекомендуют следующую методику.

50 мкл раствора, содержащего оксираны, добавляют к 1,5 мл 1,3 М тиосульфата натрия и поддерживают соляной кислотой постоянное значение рН до окончания реакции. Содержание оксирана в растворе рассчитывают, исходя из объема соляной кислоты, пошедшей на поддержание нейтрального рН.

Для определения оксирановых групп в геле агарозы рекомендуется следующая методика.

0,5 г влажной агарозы добавляют к 1,5 мл 1,3 М тиосульфата натрия (рН 7,0) и содержание оксирана в геле определяют титрованием соляной кислотой. Гель агарозы подсушивают, отсасывая на воронке со стеклянным фильтром в течение 5 мин, и взвешивают.

9.2.8. Определение емкости эфирных *n*-нитрофенильных производных оксиалкилметакрилатных гелей (НФОМ) [67]

Количество активных групп определяют спектрофотометрически по освобождению *n*-нитрофенола.

100 мг геля НФОМ суспендируют в 10 мл разбавленного (1:1) аммиака и суспензию оставляют на 1—4 ч при периодическом перемешивании. Добавляют 90 мл дистиллированной воды и измеряют оптическую плотность при 400 нм, содержание *n*-нитрофенола определяют по калибровочному графику.

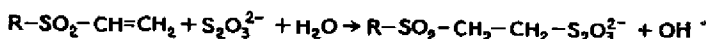
9.2.9. Определение степени замещения бензилированной сефарозы, сшитой дибромпропанолом [43]

После исчерпывающего сульфирования бензилированной и небензилированной сефарозы можно найти степень ее замещения по разности содержания серы в том и другом препарате.

75 мл лиридина добавляют по каплям к 10 мл трехокиси серы в круглодонной колбе, снабженной мешалкой и обратным холодильником и охлаждаемой баней со льдом. К 7,5 мл полученной суспензии пиридинового комплекса трехокиси серы в пробирке прибавляют 5 г тщательно промытого пиридином геля, пробирку закрывают пробкой и оставляют на 24 ч при 40 °С. Сульфированные гели затем промывают на стеклянном фильтре спиртом, водой, 1 М уксусной кислотой, содержащей 2 М хлористый натрий, 1 М карбонатом натрия, содержащим 2 М хлористый натрий, и, наконец, опять водой (по 200 мл каждого промывного раствора). Гели лиофильно высушивают и анализируют на содержание серы.

9.2.10. Определение винильных групп [36]

Определение основано на реакции

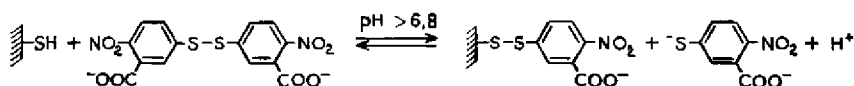


2 мл 3 М тиосульфата натрия добавляют к 2 мл сшитого геля (в воде). Гидроксил-ионы, образующиеся в результате реакции, титруют 0,1 М соляной

кислотой; титрование заканчивают при pH 5,5; это значение pH имеет 1,5 М тиосульфат натрия. Скорость реакции очень мала, и реакция заканчивается за ~10–15 ч.

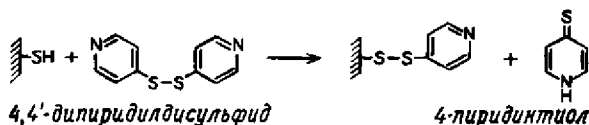
9.2.11. Определение сульфгидрильных групп [47]

Сульфгидрильные группы, связанные с гелем, можно определить с помощью реагента Элмана [5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)], при взаимодействии с которым на каждую тиольную группу освобождается 1 молекула интенсивно окрашенного 5-сульфидо-2-нитробензоата:



Содержание последнего определяют, измеряя оптическую плотность при 412 нм ($\epsilon = 1,36 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹, pH 8). Метод использован для определения SH-групп в производных сефарозы [14] и дигидролипоевой кислоты, ковалентно связанной с сефарозой [47].

Для определения можно использовать также реакцию с 4,4'-дипиридилдисульфидом [29] или 2,2'-дипиридилдисульфидом ($\lambda_{\text{max}} = 324$ нм, $\epsilon = 1,98 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹) [64]:



Тиолы, связанные с сефарозой, можно определять, исходя из их способности включать [¹⁴C]иодацетамид; для этого модифицированная сефароза обрабатывается 0,01 М иодацетамидом в 0,1 М бикарбонате натрия (pH 8,0) при комнатной температуре в течение 15 мин [14].

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ АФФИННЫХ ЛИГАНДОВ

В разд. 5.3 детально обсуждалось влияние концентрации иммобилизованных аффинных лигандов. Очевидно, что после присоединения аффинного лиганда к инертному носителю перед сорбцией очень полезно определить долю молекул, ковалентно присоединившихся к матрице. Подготовленный аффинный гель не должен содержать реакционноспособных групп (о блокировании остаю-

щихся активных групп см. разд. 8.3); его следует тщательно промыть. Приготовление гелей для практического применения рассмотрено в разд. 10.8, там же изложены методы для проверки того, что молекулы аффинного лиганда, ковалентно связанные с нерастворимым носителем,— единственные, присутствующие в геле.

9.3.1. Дифференциальный анализ

Содержание связанного с гелем аффинного лиганда можно определить по разности между общим количеством добавленного к реакционной смеси аффинного лиганда и выделенного в результате исчерпывающих промывок. Несмотря на то что такой метод иногда используется, он дает неточные результаты, особенно если ковалентно присоединяется небольшая доля добавленного лиганда или если аффинный лиганд плохо растворим и требуются большие объемы для отмывания несвязавшегося вещества. Однако метод пригоден для приблизительной оценки количества присоединившегося лиганда. Например, количество связанной ДНК определялось по разности оптической плотности при 260 нм исходного вводимого раствора ДНК и конечного промывного раствора [58].

9.3.2. Спектрофотометрические методы

Иммобилизованные аффинные лиганды, которые поглощают свет при >260 нм, можно определять, спектрофотометрируя непосредственно модифицированные гели. Гель суспендируют в оптически чистом полиакриламиде, этиленгликоле или глицерине и определяют оптическую плотность в кюветах толщиной 1 мм относительно немодифицированного геля в двулучевом спектрофотометре. Лоу и др. [48] таким образом определили при 206 нм содержание иммобилизованного NAD^+ . Содержание иммобилизованного NADH определялось при 340 нм, а иммобилизованного FAD — при 450 нм [47]. Иммобилизованные NADH , FAD и пиридоксамин флуоресцируют при облучении светом подходящей длины волны [12, 47].

При определении лейцинаминопептидазы и трипсина, ковалентно связанных с сефарозой, Кельш и др. [41] сопоставили пять методов определения связанных белков: 1) основанный на балансе белка перед и после связывания; 2) аминокислотный анализ после кислотного гидролиза; 3) модифицированный метод Лоури; 4) спектрофотометрический и 5) флуориметрический. Преимущество двух последних методов, которые они исследовали детально, состоит в том, что эти методы не приводят к разрушению геля. Как и метод Лоури, они характеризуются простотой, низким пределом обнаружения и высокой воспроизводимостью.

Для солюбилизации модифицированных агароз предложено несколько методов, позволяющих количественно спектрофотометрировать иммобилизованные аффинные лиганды [47]. Гели агарозы могут быть растворены в горячей воде, немодифицированная агароза растворяется при 60 °С. При последующем охлаждении высококонцентрированных водных растворов агарозы получают непрозрачные растворы, в то время как более разбавленные растворы становятся вязкими, но остаются прозрачными. Эти эффекты не зависят

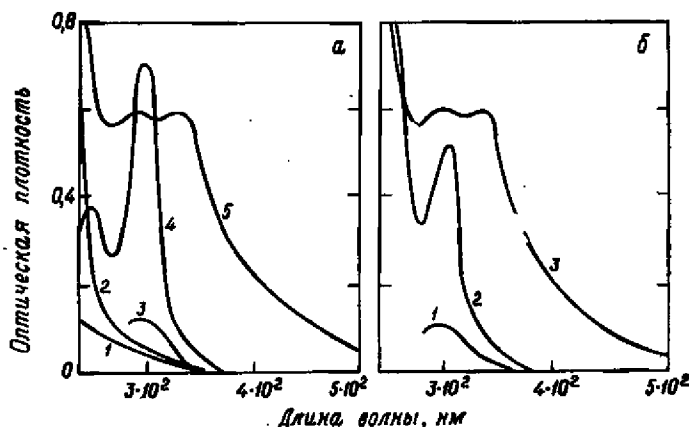


Рис. 9.1. Спектры солюбилизированной агарозы [19].

0,2 мл суспензии агарозы растворялись при 2-часовом нагревании до 75 °С в 5,0 мл растворителя: а — H₂O (1); 0,1 н. NaOH+0,1%-ный NaBH₄ (2); 50%-ная CH₃COOH (3); 0,1 н. HCl (4); б — 0,1—1 н. NaOH (перед записью спектра довели объем до 10,0 мл 1 н. NaOH) (5); 50%-ная CH₃COOH (1); 0,1 н. HCl (2); 0,1—1 н. NaOH (перед записью спектра довели до 10 мл 1 н. NaOH) (3).

от pH во всем диапазоне. Напротив, модифицированные гели не растворяются даже при нагревании до 75 °С в 8 М мочеvine или 6 М гуанидинхлориде. Они могут быть солюбилизованы при нагревании с 0,1 М соляной кислотой или едким натром при 75 °С или, что используется наиболее часто, в 50%-ной уксусной кислоте. После солюбилизации не образуется никакого заметного осадка даже при доведении pH до нейтрального.

Спектры солюбилизированной агарозы показаны на рис. 9.1 [19]. Агароза, будучи растворена в воде, прозрачна для всех длин волн >350 нм, но слегка поглощает в интервале 240—350 нм. Это поглощение прямо пропорционально концентрации агарозы и поэтому может быть исключено, если измерение производят относительно подходящего раствора сравнения. После обработки 0,1 М соляной кислотой (при 75 °С в течение 2 ч) агароза имеет значительный пик поглощения при 280 нм, обусловленный, по-видимому, фурфуролом, образование которого катализируется кислотой. На-

против, 0,1—1 М едкий натр в тех же условиях вызывает лишь частичную карамелизацию геля с широкой областью поглощения в УФ- и видимой частях спектра; возникающие при этом растворы имеют янтарный цвет. Такие изменения геля можно предотвратить, если добавить перед нагреванием 0,1% борогидрида натрия. Тогда спектры будут похожи на спектры водных растворов.

В разд. 9.2.4 уже упоминалось, что солюбилизация может быть полезна при количественном определении содержащихся в гелях аминогрупп с помощью ТНБС.

Степанов и др. [61] солюбилизовали сефарозу с ковалентно связанным моно-N-ДФ-гексаметилендиамином в 66%-ной трифторуксусной кислоте при 100°C. Полученный раствор, будучи разбавленным 20%-ной трифторуксусной кислотой, имел максимум поглощения при 360 нм (УФ-спектре), что могло быть использовано при определении содержания ДНФ-аминa (ϵ_{360} 15 000). Борхардт и др. [9] гидролизovali модифицированный гель 2 М едким натром при 100°C перед спектрофотометрическим определением 3,4-диметокси-5-оксифенилэтиламина.

Определение степени замещения в ряду агарозных гелей, модифицированных гидрофобными группами, с использованием ^1H -ЯМР-спектроскопии описано Розенгренем и др. [57].

Производные агарозы тщательно промывают и высушивают ацетоном на стеклянном фильтре. 100 г высушенного с отсасыванием геля переносят в колбу на 50 мл и добавляют 20 мл 85%-ной муравьиной кислоты; смесь нагревают с обратным холодильником 1 ч на водяной бане. Если за это время полисахаридный носитель не растворяется, время гидролиза увеличивают. После гидролиза смесь упаривают досуха, добавляют 2 мл $^2\text{H}_2\text{O}$ и вновь упаривают. Добавление и упаривание повторяют, остаток растворяют в 1 мл гексадецилоксидометилсульфоксида и используют для ЯМР-спектроскопии.

9.3.3. Кислотно-основное титрование

Содержание полярных аффинных лигандов можно определить титрованием модифицированного геля кислотой или основанием. Хиксон и Нишикава [34] определили таким образом суммарное содержание *n*-аминобензамида, связанного с помощью водорастворимого карбодимида с сукцинизированной гексаметилендиамин — сефарозой, и остающихся незамещенных карбоксильных групп.

Производное сефарозы, содержащее карбоксилатные ионы, промывают 50-кратным объемом 0,5 М хлорида натрия, измеряют объем геля после седиментации или малоскоростного центрифугирования в калиброванном центрифужном стакане. Гель титруют от pH 7 до pH 3. Всю эту процедуру повторяют после присоединения *n*-аминобензамида; концентрацию присоединенного аффинного лиганда вычисляют исходя из разности между объемами, пошедшими на титрование в двух случаях. Прямым титрованием было определено содержание N-6-(6-амингексил)-АМР на сефарозе [13].

9.3.4. Определение иммобилизованных белков, пептидов, аминокислот, нуклеотидов, углеводов и других веществ после их освобождения с помощью кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза

9.3.4.1. Определение иммобилизованных аминокислот, пептидов и белков

Наиболее часто с этой целью после кислотного гидролиза иммобилизованного аффинного лиганда используется аминокислотный анализ, разработанный Спакманом, Стейном и Муром [59]. Наибольшее распространение получила методика, описанная Аксе-ном и Эрнбеком [1].

Гели агарозы с присоединенными ферментами освобождают от буфера промыванием на стеклянном фильтре (№ 3) дистиллированной водой, водно-ацетоновой смесью, содержание ацетона в которой постепенно увеличивается. В заключение конюгаты промывают ацетоном, который удаляют в вакууме; препараты сушат в вакууме над пятиокисью фосфора в течение 48 ч. Проводят кислотный гидролиз (6 М соляная кислота) навески модифицированного геля при 110°C в течение 24 ч в закрытом эвакуированном сосуде. Аминокислотный анализ гидролизата проводят на аминокислотном анализаторе и содержание белка рассчитывают по содержанию аспарагиновой и глутаминовой кислот, аланина и лейцина. При высоком содержании углеводов гидролизат темнеет, однако это не мешает анализу.

Кельш и др. [41] предварительно очищали темный гидролизат, окраска которого обусловлена кислотным гидролизом полисахаридного носителя на ионообменной колонке. Гидролизат готовят, используя в качестве внутреннего стандарта норлейцин. После удаления HCl на роторном испарителе образцы растворяют в 2 мл 0,02 н. соляной кислоты и наносят либо на колонку (7×1 см) с амберлитом IR 120-X8 и элюируют 25 мл 1 М раствора аммиака, либо на колонку (7×1 см) с дауэксом 50W-X4 и элюируют 25 мл 10 об.%-ного водного пиридина.

Голлеман и Вайс [35] после кислотного гидролиза определили на аминокислотном анализаторе также ϵ -аминокапроновую кислоту, элюируемую непосредственно перед лизином. Свенсон [65] определил содержание модифицированных ϵ -аминогрупп по разности между количеством свободных аминогрупп перед и после модификации. Свободные аминогруппы были определены восстановительным метилированием растворами формальдегида и борогидрида. Образующиеся N- ϵ -диметиллизин и N- ϵ -метиллизин были затем определены на аминокислотном анализаторе [54].

9.3.4.2. Определение нуклеотидов

Содержание нуклеотидов, связанных с сефарозой, рассчитывают, исходя из содержания растворимого продукта, образующегося после щелочного или нуклеазного гидролиза [32]. Поглощающий в УФ-области материал, образующийся в супернатанте в результате гидролиза, определяют, измеряя оптическую плотность раствора, гидролиз останавливают, когда оптическая плотность перестает возрастать.

Для щелочного гидролиза 1 мл модифицированного геля смешивают с 1 мл 0,6 М едкого натра, смесь инкубируют при 37 °С. Для ферментативного гидролиза рибонуклеазой Т2 смешивают 0,5 мл модифицированного геля с 0,5 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН 4,6), содержащего 1 ед. рибонуклеазы Т2. Инкубацию также проводят при 37 °С. Ферментативный гидролиз фосфодиэстеразой проводят в 0,1 М трис-НСl-буфере (рН 8,5), содержащем 0,01 М хлорида магния. 1 мг фосфодиэстеразы яда змеи обрабатывают 0,5 мл модифицированного геля. Берглунд и Экштейн [7] использовали и фосфодиэстеразу, и щелочную фосфатазу для гидролиза сефарозы с присоединенными к ней *п*-аминофенил-АТР или *п*-аминофенил-dАТР, определяя нуклеотид в гидролизате. Подобным образом после ферментативного гидролиза щелочной фосфатазой определялось содержание иммобилизованного АМР анализом фосфата, отщепляющегося от конца молекулы АМР [13].

Исходя из общего содержания фосфора [39], Моудгил и Тофт [52] рассчитали количество АТР, связанного с сефарозой. Образец вначале окисляют 7%-ной хлорной кислотой в 4,5 М серной кислоте, а затем инкубируют при 240 °С в течение 60 мин.

9.3.4.3. Определение углевода

Хожейши и Коцоурек [36] предложили следующую методику определения содержания углеводов в сополимерах.

0,1 г сухого порошка геля гидролизуют кипячением с обратным холодильником в 2,5 М серной кислоте в течение 6 ч. После охлаждения содержание углеводов в супернатанте определяют фенолсерноокислотным методом по Дюбуа и др. [16].

Галактозилпирофосфат, связанный с сефарозой, определяли анализом фосфатов после гидролиза 0,5 М соляной кислотой при 100 °С в течение 1 ч [4]. Подобным образом иммобилизованный *N*-ацетилглюкозамин определяли по содержанию освобождающегося глюкозамина после кислотного гидролиза 6 М соляной кислотой при 110 °С [4].

После гидролиза модифицированного образца гепарин — сефарозы содержание гепарина установлено по результатам определения сульфатов [62].

9.3.5. Определение количества связанного аффинного лиганда элементарным анализом

Содержание иммобилизованных нуклеозидов наиболее часто рассчитывают, исходя из общего содержания фосфора [33, 44, 66], методики определения которого описаны в работах [5, 39, 51].

Сульфаниламид, связанный с сефарозой, можно определить анализом содержания серы [20].

Расчет содержания иммобилизованных аффинных лигандов по анализу азота иногда приводит к ошибкам. Как уже обсуждалось в разд. 8.2.4, в ходе активации бромцианом в гель вводится азот; количество последнего зависит от температуры, при которой проводится активация [53]. Однако содержание иммобилизованных белков, в особенности антител, часто рассчитывают по азоту, определяемому методом Кьельдаля [50].

9.3.6. Определение меченых аффинных лигандов

Во многих случаях для связывания с нерастворимыми носителями использовались аффинные лиганды, меченные радиоактивными изотопами. Связанный аффинный лиганд легко определяется на основе измерения радиоактивности. Например, Грин и Сомс [30] определили таким образом количество биотина, связанного с сефарозой.

По 0,1 мл суспензии отбирают с помощью силиконизированного туберкулинового шприца на 0,25 мл или питетки Эппендорфа и наносят в центр мишени площадью 4 см. К каждому образцу добавляют 0,05 мл 1%-ного додецилсульфата натрия. Образцы сушат и измеряют радиоактивность. Контрольные эксперименты с известным количеством [^{14}C]-биотина, связанного с авидии — сефарозой, показали, что поправка на самопоглощение составляет $\leq 11\%$.

9.3.7. Колориметрическое определение иммобилизованного диаминопропиламина с нингидрином [35]

0,1 мл аминокислот агарозы разбавляют до 2 мл водой и добавляют 5 мл раствора нингидрина (4 мг нингидрина растворяют в 150 мл метилцеллозольва и 50 мл 4 н. ацетатного буфера, pH 5,5, и добавляют 80 мг SnCl_2 в токе азота). Смесь нагревают 20 мин на кипящей водяной бане, добавляют 7 объемов 50%-ного спирта; агарозу затем удаляют центрифугированием при 2000 г в течение 10 мин. Измеряют оптическую плотность супернатанта при 750 нм относительно контрольного образца (готовят из немодифицированной агарозы идентичным образом). Если содержание 3,3'-диаминодипропиламина определяют по графику, построенному для растворов свободного 3,3'-диаминодипропиламина, следует вносить поправку, поскольку свободный 3,3'-диаминодипропиламин имеет две первичные аминогруппы, а связанный с сефарозой — одну.

9.3.8. Определение иммобилизованных белков по содержанию триптофана [17]

Эскамани и др. [17] применили метод определения триптофана, основанный на взаимодействии с нингидрином в кислоте [27], к определению белков, связанных с нерастворимыми носителями.

К свободному или иммобилизованному ферменту в 1 мл воды или разбавленного 0,02 М буфера добавляют по 1 мл нингидринового реагента (250 мг нингидрина в смеси 6 мл 90%-ной муравьиной кислоты и 4 мл конц. HCl). Приготовленные таким образом смеси в закрытых колпачками пробирках инкубируют в водяной бане при 100 °C в течение 20 мин, охлаждают и отбирают из каждой пробирки по 1 мл; пробы разбавляют 9 мл 95%-ного спирта.

Определяют оптическую плотность полученных растворов при 400 нм относительно контрольного образца (готовят из того же количества нерастворимого носителя без фермента). Поскольку коллаген не содержит триптофана, этот метод может быть использован для определения содержания белков, ковалентно связанных с коллагеном. Таким образом построен калибровочный график для лактозы и глюкоамилазы в присутствии коллагена (рис. 9.2).

Другим колориметрическим методом определения белков является метод Лоури и др. [49]. Хейвкес и др. [31] применили его

к определению глутаматдегидрогеназы, связанной с сефарозой, причем реакционная смесь перемешивалась в течение 20 мин и перед измерением оптической плотности фильтровалась.

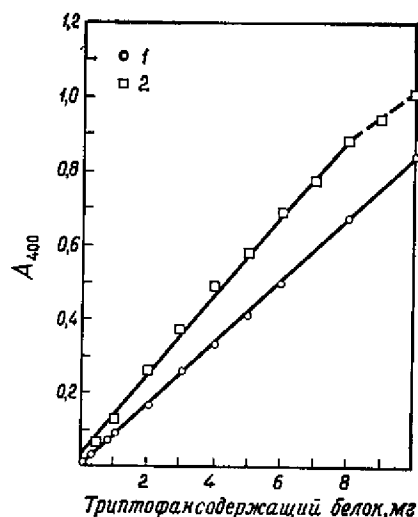


Рис. 9.2. Определение триптофансодержащего белка в присутствии коллагена [17].

Стандартный раствор лактазы был приготовлен растворением 100 мг лиофилизированной β -галактозидазы в 10 мл 0,02 М фосфатного буфера (pH 7,0). Стандартный раствор глюкоамилазы был приготовлен подобным образом в 0,02 М ацетатном буфере (pH 4,0). Аликвоты разбавлялись до 1,0 мл тем же буфером и к каждому раствору добавлялось по 21,0 мг коллагеновой пленки. К пробам и контрольному раствору коллагена добавлялось по 1 мл нингидринового реагента и растворы инкубировали 20 мин в водяной бане при 100 °С. После охлаждения аликвоты по 1 мл разбавлялись 9 мл 95%-ного спирта и измерялась оптическая плотность при 400 нм относительно раствора коллагена. 1 — лактаза, 2 — глюкоамилаза. Прямые рассчитаны по методу наименьших квадратов с учетом всех точек, за исключением двух наибольших значений для глюкоамилазы.

9.4. ТИТРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОТЕИНАЗ

После связывания ферментов с нерастворимыми носителями их свойства могут меняться либо под влиянием микроокружения, либо в результате изменений, вызванных химической модификацией благодаря образованию новых ковалентных связей. Следовательно, очень полезно охарактеризовать фермент не только определением общей ферментативной активности и количества связанного белка, но и путем титрования активных центров.

Титрование активного центра трипсина, разработанное Чейзом и Шоу [11], основано на специфической стехиометрической реакции трипсина с субстратоподобным реагентом *n*-нитрофенил-*n'*-гуанидинобензоатом (НФГБ). Реакция дает относительно стабильный ацилированный фермент с одновременным «выбросом» *n*-нитрофенола. Количество определяемого спектрофотометрически *n*-нитрофенола в «выбросе» пропорционально количеству активного фермента. Этот метод был использован Фритцем и др. [24] и Кнайтсом и Лайтом [40] для определения активного трипсина после его ковалентного связывания с носителем. На рис. 9.3 показана схема циркуляционной системы титрования, описанной Фордом и др. [23] для титрования активных центров трипсина, ковалентно связанного со стеклом.

Объем раствора в системе доведен до 5—6 мл путем использования небольшого (~1 мл) резервуара. Реактор, удаленный из системы, содержит только образец — около 50 мг тщательно промытого иммобилизованного фермента. Остальную систему заполняют 0,03 мМ раствором НФГБ (свежеприготовленным; 3 мМ НФГБ в диметилсульфоксиде разбавляют 50 мМ вероналовым буфером, pH 8,3). Содержимое перекачивают со скоростью 10 мл/мин. Регистрирующий прибор спектрофотометра выставляют на ноль при длине волны 410 нм в диапазоне 0,1 ед. оптической плотности и записывают медленный рост поглощения, обусловленный спонтанным гидролизом.

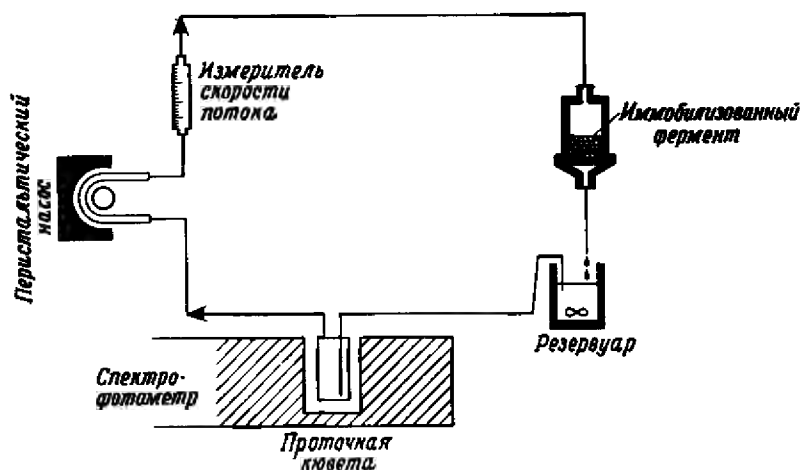


Рис. 9.3. Циркулирующая система титрования [23].

Перед титрованием активных центров останавливают насос, вводят в систему реактор, содержащий фермент, включают насос с медленной скоростью, переворачивают реактор на короткое время, чтобы удалить из него воздух, и, наконец, повышают скорость циркуляции до 10 мл/мин. На рис. 9.4 показано увеличение светопоглощения в результате «выброса» и последующий после «выброса» гидролиз, записанные на диаграммной ленте самописца. Раствор содержит большой избыток НФГБ относительно стехиометрического количества: наблюдаемые на начальном участке диаграммы колебания объясняются небольшой «пробкой» *n*-нитрофенола в результате быстрой реакции приблизительно стехиометрического объема раствора титранта с ферментом, когда этот раствор проходит через реактор. Осцилляции быстро демпфируются, когда «пробка разбивается», и концентрация *n*-нитрофенола во всей системе становится постоянной. «Выброс» определяется путем простой экстраполяции начальной и последующей кинетических кривых гидролиза к началу контакта фермента и титранта.

Жидкость выкачивают из системы и ее объем точно замеряют. Иммобилизованный фермент аккуратно удаляют из реактора, высушивают при 90 °С и взвешивают. Содержание *s* молей активного трипсина (мкмоль/г) в стекле может быть рассчитано по следующему уравнению:

$$s = 10^6 \Delta v / \epsilon_{410} w b, \quad (9.1)$$

где ΔA — оптическая плотность «выброса»; v (мл) — общий объем жидкости; ϵ_{410} — коэффициент экстинкции *n*-нитрофенола ($1,66 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹); w (мг) — масса стекла; b (см) — толщина кюветы. Из рис. 9.4 видно, что

оптическая плотность «выброса» составляет 0,0265 ед., $v=5,1$ мл, содержание активного трипсина в стекле 0,13 мкмоль/г.

Увеличение концентрации ИФГБ в 5 раз не влияет на «выброс». Исключение диметилсульфоксида также не сказывается на результатах.

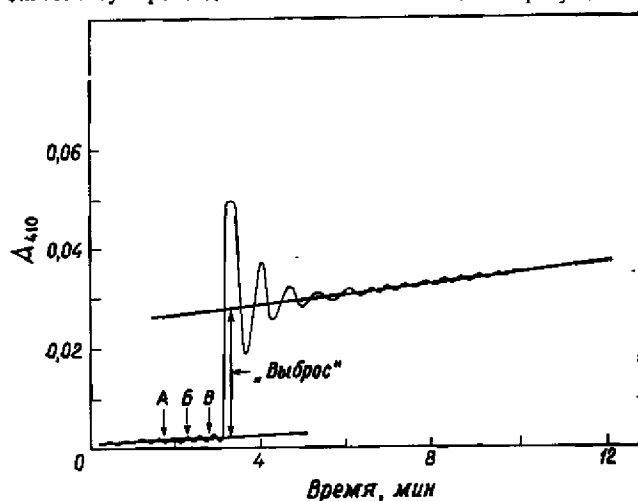


Рис. 9.4. Диаграмма титрования активного центра [23].

62,1 мг стеклянных частиц диаметром 35 мкм со связанным трипсином титровали 5,1 мл 0,03 мМ *п*-нитрофенилового эфира *п*'-гуанидинобензойной кислоты в 50 мМ вероналовом буфере (рН 8,3). А — выключение насоса; Б — подключение реактора к системе; В — повторное включение насоса; «выброс» соответствует оптической плотности 0,0265 ед.

Титрование активного центра химотрипсина, ковалентно связанного с сефадексом G-200, описано Гейблом [25], который в качестве титрующего агента использовал 4-метилумбеллиферил-*п*-(*N,N,N*-триметиламмоний)циннамат (МУТМАЦ). Этот флуорогенный титрующий активные центры реагент позволяет определять даже 0,02 нмоль фермента.

МУТМАЦ (100 мкл 0,2 мМ водного раствора) добавляют к 2 мл 0,1 М боратного буфера (рН 7,5), помещенных в кювету спектрофлуориметра, и записывают базовую линию. Суспензию (50—200 мкл) тщательно размешанного сефадекса со связанным химотрипсином вносят при перемешивании в кювету, перемешивание продолжают еще 30 с. Записывают кривую флуоресценции освобождающегося 4-метилумбеллиферона; она достигает постоянного значения через 1 мин. Отсюда рассчитывают концентрацию активных центров. Вычисленная концентрация активного фермента не зависит от объема суспензии и количества МУТМАЦ и становится постоянной после перемешивания в течение 15 с—1 мин.

Для протеиназ, активность которых определяется единственной титруемой SH-группой, например для протеиназы из *Streptococcus*, можно использовать для титрования активных центров 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойную кислоту) (см. разд. 9.2.11).

9.5. ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БЕЛКОВ

Изменения в поведении аффинных лигандов после их связывания с нерастворимым носителем большей частью объясняются

модификацией при связывании, влиянием нового микроокружения, диффузионным лимитированием и т. п. Реже предполагается, что такие изменения обусловлены конформационными факторами, несмотря на то что по сравнению с нативными ферментами устойчивость аффинных лигандов к тепловой инактивации или денатурирующим агентам явно указывает на конформационные изменения или предрасположенность к таковым в результате связывания фермента с носителем. Среди различных физико-химических методов, разработанных для исследования конформации белков в растворе, наиболее легко применимым для конформационных исследований иммобилизованных белков является, по-видимому, флуоресцентный метод, для которого и интенсивность, и характер спектра зависят от окружения флуоресцирующих групп и реагируют на изменения этого окружения.

Сильное светорассеяние, обусловленное матрицей, может затруднять измерения. Однако концентрация белков в иммобилизованных ферментах достаточно высокая. Следовательно, оптическая плотность растворов белков в области полос поглощения, как правило, высока. Таким образом, поглощение света эффективно конкурирует со светорассеянием. При возбуждении свет поглощается очень тонким слоем поверхности конъюгата белок — матрица, и поэтому флуоресценцию следует наблюдать с фронтальной части поверхности носителя с иммобилизованным белком. Кроме того, поскольку излучение имеет большую длину волны по сравнению с длиной волны при возбуждении, флуоресценция может быть легко отделена от светорассеяния. Гейбл и др. [26] описали кювету, с помощью которой им удалось методом флуоресценции исследовать конформационные изменения иммобилизованных трипсина и химотрипсина, вызываемые мочевиной, нагреванием или присутствием специфических лигандов. Поскольку эту кювету не всегда можно применять, Барел и Рузенс [3] сконструировали очень простую цилиндрическую флуоресцентную кювету, схема которой показана на рис. 9.5.

Верхняя часть кюветы из нержавеющей стали 1 снабжена тефлоновой трубкой и соединением 2; тефлоновый адаптер 3 соединен с цилиндрической микрокюветой 4; нижняя часть из нержавеющей стали 2 соединена с тефлоновой трубкой и винчивающимся адаптером из нержавеющей стали 7. В микрокювету (кварцевую трубку с внешним диаметром 5,0 мм и внутренним диаметром 3,0 мм) плотно вставлен пористый тефлоновый диск 5. Держатель кюветы изготавливается из алюминия и помещается в обычное отделение для кюветы флуориметра. Необходимо удалить вывинчивающуюся ручку, фиксирующую кюветное отделение в приборе; эту ручку заменяют другой с отверстием для прохода тефлоновых трубок. Преимущества использования цилиндрической кюветы (даже если светорассеяние в ней превышает рассеяние в прямоугольной кювете) состоят в том, что цилиндрическая кювета может быть использована в качестве хроматографической колонки, легко отмывается и используется повторно, кроме того, количество материала при работе с цилиндрической кюветой вдвое меньше, чем для выпускаемых промышленностью прямоугольных кювет (50 мкл вместо 100 мкл).

Барел и Рузене [3] использовали спектрофлуориметр Aminco Bowman SPF, который снабжен фотоумножителем RCA R4465, эллиптической конденсорной системой и двухкоординатным самописцем Houston 2000. Найдено, что коррек-

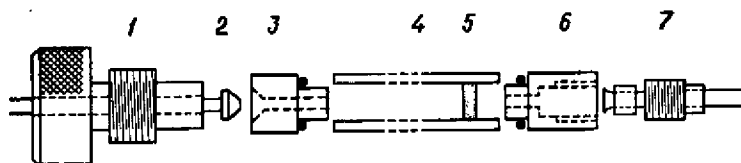


Рис. 9.5. Схема флуоресцентной кюветы [3].

ция спектров излучения не нужна, потому что спектральный ответ детектирующей системы (т.е. монохроматора с фотоумножителем) остается постоянным ($\pm 10\%$) от 300 до 500 нм. Чтобы уменьшить светорассеяние круглой кюветой, необходимо сузить пучок возбуждающего света с помощью щели диаметром 1 мм. Комбинируя различные щели, можно добиться ширины возбуждающей и излучающей полос света в 10 нм. Все опыты проводили при комнатной температуре.

Для того чтобы получить воспроизводимые спектры флуоресценции нерастворимых белков, необходимо начинать с полностью открытой кюветы. Микрокювету 4 с диском 5 (рис. 9.5) с помощью пастеровской пипетки наполняют гелем белок—агарозы (максимальный объем геля 100 мкл, но обычно достаточно 50 мкл) и гель немедленно покрывают 100 мкл буфера, пригодного для элюирования. Тефлоновый адаптер 3 соединяют с микрокюветой и ячейку частично собирают (части 3—7). Наконец, ячейку вставляют в кюветодержатель и помещают в спектрофлуориметр вместе с верхней частью (1). Затем с помощью перистальтического насоса через гель пропускают элюирующий буфер. Используют скорости потока 0,2—0,5 мл/мин. Все спектры записывают после того, как гель промывают в течение 10—15 мин буфером. Гели белок—сепарозы 4В облучают только в течение времени, необходимого для записи спектров излучения, для того чтобы фотоинaktivация геля была минимальна. Образцы геля с присоединенным белком можно использовать повторно, если работать по описанной методике, причем показано, что фотоинaktivация образцов белка незначительна. Легко можно получить спектры флуоресценции примерно для 0,2—300 мкг белка, ковалентно связанного с сепарозой 4В.

Не надо специально объяснять, что ту же кювету можно применять для классической флуориметрии образцов белка в растворе. В этом случае раствор белка вводят в верхнюю часть проточной кюветы. Это позволяет, сохраняя в целом геометрию кюветы постоянной, сравнить спектры флуоресценции белков в растворе и на нерастворимой матрице. Были исследованы растворы α -лактальбумина в интервале концентрацией 0,05—0,15 мг/мл в 0,05 М буфере (рН 7,5).

Описанная методика применена Барелом и Прайелсом [2] для исследования конформационных изменений различных α -лактаминов, связанных с агарозными носителями.

Берлинер и др. [8] изучили конформационные изменения трипсина, спин-меченного 1-оксил-2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидинилметилфторфосфатом, при помощи ЭПР-спектроскопии. Бенко и др. [6] исследовали влияние связывания метгемоглобинов на частичках латекса на конформационные изменения связанных белков с использованием скоростей продольной магнитной релаксации протонов растворителя.

9.6. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ, СВЯЗАННЫХ С НЕРАСТВОРИМЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

Поскольку многие биологически активные вещества в природе находятся в связанном с мембраной состоянии или в форме других нативных сложных структур, хорошо охарактеризованные нерастворимые носители со связанными биологически активными молекулами также представляют собой модели, достойные исследования. Исходя из теоретической и практической значимости полезно знать пространственное распределение ковалентно связанных биологически активных молекул.

Наиболее часто применяемым методом является флуоресцентная микроскопия, молекулы белка метятся флуоресцеинизотиоцианатом и становятся благодаря этому «видимыми» [22, 45, 60]. Для того чтобы сделать видимой лейцинаминопептидазу, связанную с сефарозой или сефадексом, Лаш и др. [45] использовали две методики. Согласно одной методике, флуорохромный флуоресцеинизотиоцианат ковалентно связывался с белком перед его присоединением к нерастворимому носителю, согласно другой — антитела к ферменту метились производным флуоресцеина.

Фермент метят флуорохромным флуоресцеинизотиоцианатом путем анализа при энергичном перемешивании при 4°C в течение 8 ч 2 мл 13,8 мкМ раствора фермента против 257 мкМ раствора флуоресцеинизотиоцианата. Оба раствора готовят в 0,1 М бикарбонате натрия. После диализа смесь наносят на колонку с сефадексом G-25. Фермент, меченный флуоресцеином, проходит через колонку без задержки и почти без разбавления, в то время как флуоресцеинизотиоцианат сильно адсорбируется гелем. Он может быть частично элюирован пятикратным (относительно объема колонки) объемом 0,1 М бикарбоната натрия.

Антисыворотку к лейцинаминопептидазе метят таким же способом.

Связывание фермента, меченного флуоресцеином, на активированных бромцианом сефарозе или сефадексе осуществляют аналогично связыванию немеченного фермента. Меченные флуоресцеином антитела связывают на ферменте, иммобилизованном на матрице, из 0,1 М раствора бикарбоната натрия. Неразбавленную меченую антисыворотку смешивают с равным объемом суспензии фермента, связанного с нерастворимым носителем, и термостатируют 1 ч при 37°C и еще 12 ч при 4°C. После перенесения материала на стеклянный фильтр неспецифически сорбированные компоненты удаляют интенсивным промыванием 0,1 М бикарбонатом натрия.

Для определения распределения белка внутри гранул носителя готовят тонкие срезы носителя с прикрепленным ферментом, принимая меры предосторожности против нарушения структуры матрицы. Для этого гранулы носителя включают в 20%-ную желатину. Частицы геля выдерживают 6 ч при 37°C в растворе желатины, затем смесь переносят в подходящий для этих целей небольшой контейнер и оставляют на несколько часов в холодильнике. Желатиновые блоки заморают, их режут микротомом на образцы толщиной 10 мкм. Полученные срезы наносят на предметные стекла и покрывают тонкими покровными стеклами для предохранения от высыхания. С помощью флуоресцентного спектрофотометра записывают спектры поглощения и излучения флуоресцеинизотиоцианата меченой флуоресцентном аминопептидазы, как свободной, так и связанной с агарозным или декстрановым носителем.

В работах с мечением белков флуоресценцином для их обнаружения показана однородность распределения белков в геле. Однако Дэвид и др. [15], которые исследовали распределение белка методом радиоавтографии ^{125}I -меченой пероксидазы, связанной с сефарозой, не обнаружили связывания фермента внутри гранул сефарозы. Лаш и др. [46] нашли, что расхождения объясняются не методами обнаружения белка, а разными методами его иммобилизации. Используя электронную микроскопию ферритина, связанного с сефарозой, они продемонстрировали, что использование очень эффективного метода связывания, а именно большого избытка ферритина в ходе связывания (>50 мг/мл), с эффективностью связывания $>90\%$ приводит к вогнутой кривой распределения ковалентно связанного ферритина, в то время как при эффективности связывания $>50\%$ наблюдается снова однородное распределение связанного ферритина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Axén R., Ernback S., Eur. J. Biochem., **18**, 351—360 (1971).
2. Barel A. O., Prieels J. P., Eur. J. Biochem., **50**, 463—473 (1975).
3. Barel A. O., Rocsens H., Anal. Biochem., **60**, 505—511 (1974).
4. Barker R., Olsen K. W., Shaper J. H., Hill R. L., J. Biol. Chem., **247**, 7135—7147 (1972).
5. Barlett G. R., J. Biol. Chem., **234**, 466—468 (1959).
6. Benko B., Vuk-Pavlović S., Dezelić G., Merićić S., J. Colloid Interface Sci., **52**, 444—451 (1975).
7. Berglund O., Eckstein F., Eur. J. Biochem., **28**, 492—496 (1972).
8. Berliner L. J., Miller S. T., Uy R., Royer G. P., Biochim. Biophys. Acta, **315**, 195—199 (1973).
9. Borchardt R. T., Cheng C., Thakker D. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., **63**, 69—77 (1975).
10. Brenna O., Pace M., Pietta P. G., Anal. Chem., **47**, 329—331 (1975).
11. Chase T., Jr., Shaw E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **29**, 508—514 (1967).
12. Collier R., Kohthaw G., Anal. Biochem., **42**, 48—53 (1971).
13. Craven D. B., Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., **41**, 329—333 (1974).
14. Cuatrecasas P., J. Biol. Chem., **245**, 3059—3065 (1970).
15. David G. S., Chino T. H., Resifeld R. A., FEBS Lett., **43**, 264—266 (1974).
16. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., Anal. Chem., **28**, 350—356 (1956).
17. Eskamani A., Chase T., Jr., Freudenberger J., Gilbert S. G., Anal. Biochem., **57**, 421—428 (1974).
18. Esko K., Karlsson S., Porath J., Acta Chem. Scand., **22**, 3342—3344 (1968).
19. Failla D., Santi D. V., Anal. Biochem., **52**, 363—368 (1973).
20. Falkbring S. O., Göthe P. O., Nyman P. O., Sundberg L., Porath J., FEBS Lett., **24**, 229—235 (1972).
21. Felix A. M., Jimenez M. H., Anal. Biochem., **52**, 377—381 (1973).
22. Fey H., Jost R., Experientia, **29**, 1314—1316 (1973).
23. Ford J. R., Chambers R. P., Cohen W., Biochim. Biophys. Acta, **309**, 175—180 (1973).
24. Fritz H., Gebhardt M., Meister R., Ilchmann K., Hochstrasser K., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 571—574 (1970).
25. Gabel D., FEBS Lett., **49**, 280—281 (1974).
26. Gabel D., Steinberg I. Z., Katchalski E., Biochemistry, **10**, 4661 (1971).

27. Gaitonde M. K., Dovey T., *Biochem. J.*, **117**, 907—911 (1970).
28. Goldstein L., *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 1—17 (1973).
29. Grasseti D. R., Murray J. F., Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 41—49 (1967).
30. Green N. M., Toms E. J., *Biochem. J.*, **133**, 687—700 (1973).
31. Havekes L., Bückmann F., Visser J., *Biochim. Biophys. Acta*, **334**, 272—286 (1974).
32. Hayashi H., *J. Biochem. (Tokyo)*, **74**, 203—208 (1973).
33. Hipwell M. C., Hervey M. J., Dean P. D. G., *FEBS Lett.*, **42**, 355—359 (1974).
34. Hixson H. F., Jr., Nishikawa A. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 501—509 (1973).
35. Holleman W. H., Weiss L. J., *J. Biol. Chem.*, **251**, 1663—1669 (1976).
36. Horejš V., Kocourek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 346—351 (1973).
37. Inman J. K., *Methods Enzymol.*, **34**, 30—58 (1974).
38. Inman J. K., Dintzis H. M., *Biochemistry*, **8**, 4074—4082 (1969).
39. King E. G., *Biochem. J.*, **28**, 292—297 (1932).
40. Knights R. J., Light A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 377—386 (1974).
41. Koelsch R., Lasch J., Marquardt I., Hanson H., *Anal. Biochem.*, **66**, 556—567 (1975).
42. Kornbluth R. A., Ostro M. J., Rittmann L. S., Fondy T. P., *FEBS Lett.*, **39**, 190—194 (1974).
43. Laas T., *J. Chromatogr.*, **111**, 373—387 (1975).
44. Lamed H., Levin Y., Wilchek M., *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 231—235 (1973).
45. Lasch J., Iwig M., Hanson H., *Eur. J. Biochem.*, **27**, 431—435 (1972).
46. Lasch J., Iwig M., Koelsch R., David H., Marx I., *Eur. J. Biochem.*, **60**, 163—167 (1975).
47. Lowe C. R., Dean P. D. G., *Affinity Chromatography*, Wiley, New York, London, 1974, p. 272.
48. Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Dean P. D. G., *Biochem. J.*, **133**, 499—506 (1973).
49. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275 (1951).
50. Matheka H. D., Mussgay M., *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **27**, 13—22 (1969).
51. Meun D. H. C., Smith K. C., *Anal. Biochem.*, **26**, 364—368 (1968).
52. Moudgil V. K., Toft D. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 901—905 (1975).
53. Nishikawa A. H., Batton P., *Anal. Biochem.*, **64**, 268—275 (1975).
54. Ottesen M., Svensson B., *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **38**, 445—456 (1971).
55. Porath J., Janson J.-C., Laas T., *J. Chromatogr.*, **60**, 167—177 (1971).
56. Porath J., Laas T., Janson J.-C., *J. Chromatogr.*, **103**, 49—62 (1975).
57. Rosengren J., Pahlman S., Glad M., Hjertén S., *Biochim. Biophys. Acta*, **412**, 51—61 (1975).
58. Schabert J. C., *J. Chromatogr.*, **73**, 253—256 (1972).
59. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Anal. Chem.*, **30**, 1190—1206 (1958).
60. Stage D. E., Mannik M., *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 382—391 (1974).
61. Stepanov V. M., Lavrenova G. L., Borovikova V. P., Balandina G. N., *J. Chromatogr.*, **104**, 373—377 (1975).
62. Sternbach H., Engelhardt R., Lezius A. G., *Eur. J. Biochem.*, **60**, 51—55 (1975).
63. Sundberg L., Porath J., *J. Chromatogr.*, **90**, 87—98 (1974).
64. Svensson A., Carlsson J., *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 433—438 (1975).
65. Svensson B., *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 954—963 (1976).
66. Trayner I. P., Trayner H. R., Small D. A. P., Bottomley R. C., *Biochem. J.*, **139**, 609—623 (1974).
67. Turková J., *Methods Enzymol.*, **44**, 66—83 (1977).

Общие вопросы сорбции, элюирования и неспецифического связывания

Эта глава содержит краткий обзор факторов, определяющих практическое использование аффинной хроматографии. Большая часть этих факторов уже детально рассмотрена в предшествующих главах, главная задача данной главы состоит в рассмотрении их взаимосвязи.

10.1. УСЛОВИЯ СОРБЦИИ

Изучение оптимальных условий сорбции предполагает, что аффинный лиганд присоединен к нерастворимому носителю с достаточно высокой пористостью и на достаточном расстоянии от его поверхности (разд. 5.1), чтобы сохранить даже после присоединения высокое сродство к выделяемому веществу (разд. 5.2). Емкость специфического сорбента определяется концентрацией доступных аффинных лигандов и их константами диссоциации из комплекса с выделяемым веществом (рис. 3.3). В разд. 5.3 уже обсуждалась оптимальная концентрация иммобилизованного аффинного лиганда, которая должна была бы обеспечить достаточную емкость и одновременно позволить освобождаться выделяемому веществу из специфического комплекса с иммобилизованным аффинантом в достаточно мягких условиях, не приводя, однако, к неспецифической сорбции. Свойства пространственной группы, вводимой между аффинным лигандом и поверхностью нерастворимой матрицы [6], могут оказывать влияние на свойства сорбента, как и концентрация аффинного лиганда. Специфический сорбент должен быть приготовлен таким способом, чтобы все группы, способные к присоединению, были блокированы (разд. 8.4) и чтобы число групп, способных принимать участие в неспецифической сорбции, было минимальным (разд. 10.3). Однако особенно важно, чтобы все молекулы аффинного лиганда, которые не присоединились к носителю ковалентной связью, были тщательно отмыты (разд. 8.6).

Поскольку ионные и водородные связи, гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса — Лондона могут в различной степени участвовать в связывании комплементарных участков аффинного лиганда и выделяемых веществ, в каждом случае долж-

ны быть свои оптимальные условия для сорбции и десорбции. Как правило, исходные условия для сорбции должны быть выбраны таким образом, чтобы они обеспечивали максимальное связывание выделяемого вещества. Выбор исходного буфера в основном определяется оптимальными условиями комплексообразования аффинного лиганда с выделяемыми веществами, а также температурой, рН и ионной силой; кроме того, этот выбор зависит также от содержания ионов металлов и других специфических факторов.

10.1.1. Влияние температуры, рН и солей

Влияние температуры в аффинной хроматографии обсуждалось в разд. 5.5. На рис. 10.1 приведен практический пример, показывающий уменьшение с повышением температуры сорбции смеси нуклеаз на сефарозе 4В с присоединенным 3'-(4'-аминофенилфосфорил)дезокситимидин-5'-фосфатом [2].

Практическое использование рН при сорбции нейтральной протеазы из *Bacillus subtilis* на сефарозе с присоединенным глицил-D-

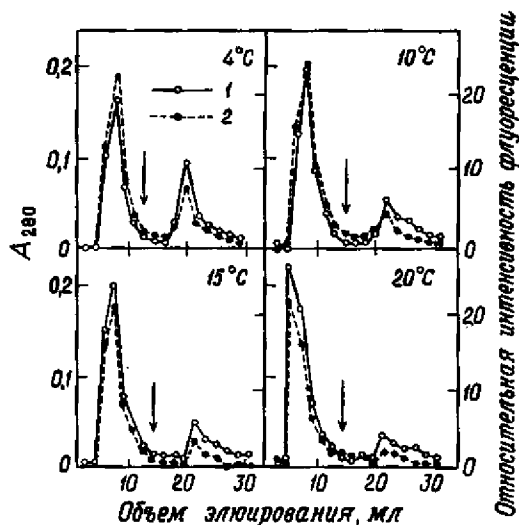


Рис. 10.1. Аффинная хроматография смеси, содержащей нуклеазу-Т-(6-48), нуклеазу-(49, 50-126) и нуклеазу-(99-149) в присутствии Ca^{2+} при различных температурах на сефарозе 4В, замещенной 3'-(4'-аминофенилфосфорил)дезокситимидин-5'-фосфатом (сефароза-pdTp) [2].

Смесь, содержащую 0,085 мкмоль нуклеазы-Т-(6-48), 0,060 мкмоль нуклеазы-(49, 50-126), 0,067 мкмоль нуклеазы-(99-149) и 0,01 М хлорид кальция в 0,2 мл 0,1 М раствора ацетата аммония (рН 8), уравнивали при данной температуре и наносили на колонку (40×10 мм) с рубашкой с сефарозой-pdTp. Элюирование проводили раствором: 0,1 М ацетат аммония + 0,01 М хлорид кальция (рН 8). Стрелками указаны моменты, в которые начиналось элюирование 0,1 н. уксусной кислотой. Относительную интенсивность триптофановой флуоресценции во фракциях определяли для регистрации нуклеазы-(90-149), имеющей единственный триптофановый остаток. 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — относительная интенсивность флуоресценции.

фенилаланином (через пространственную группу в 23 атома, образуемую комбинацией триэтилентетрамина, янтарной кислоты и этилендиамин) показано на рис. 10.2. Максимальная сорбция нейтральной протеазы имеет место при рН, соответствующих мини-

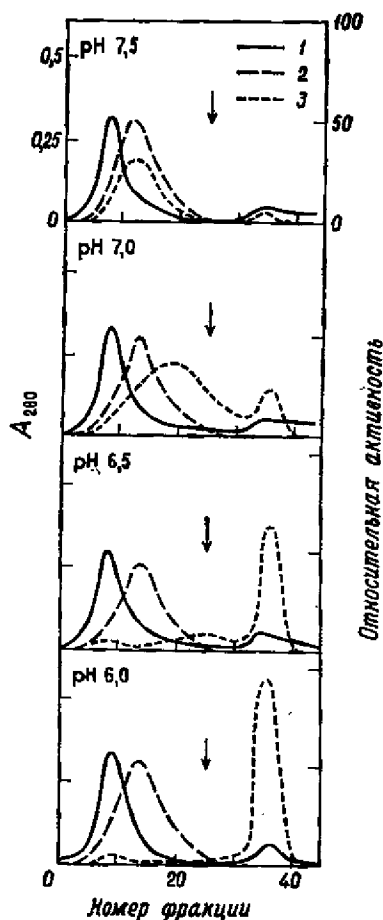


Рис. 10.2. Влияние рН на адсорбцию нейтральной протеазы на сефарозе 4В, замещенной триэтилентетрамином, янтарным ангидридом, триэтилентетрамином и хлорацетил-D-фенилаланином [40].

Неочищенный фермент (10 мл) растворяли в 0,1 мл уравнивающего буфера и наносили на аффинную колонку (220×6 мм), уравнивающую 100 мМ хлоридом натрия, 10 мМ хлоридом кальция, содержащим 5 мМ трис (рН 7,5 или 7,0) или 5 мМ 2-(N-морфолино)этансульфокислоту (рН 6,5 или 6,0). После элюирования в течение 1 ч при 25 мл/ч каждая колонка промывалась 100 мМ хлоридом натрия, 10 мМ хлоридом кальция, 50 мМ трис (рН 9,0), как указано стрелками. Нейтральная протеаза и субтилизин идентифицированы по каталитической активности в отношении гидролиза 3-(2-фурилакрилоил) глицил-L-лейцинамида (ФАГЛА) и этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (ЭЭАТ). 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — относительная плотность по ЭЭАТ; 3 — относительная активность по ФАГЛА.

мальным K_m . Нейтральная протеаза эффективно адсорбируется в интервале рН 5—6,5 и таким образом отделяется как от субтилизина, так и от других белков, присутствующих в фильтрате культуры. При более высоких рН нейтральная протеаза не может быть эффективно отделена от субтилизина. Из комплекса с иммобилизованным аффинным лигандом нейтральную протеазу освобождают, повышая рН, до значений, при которых связывание субстрата уже ослабевает, но денатурация фермента еще не происходит. Оптимальное значение рН для элюирования нейтральной протеазы

определяется не только ее родством к аффинному лиганду и зависимостью этого родства от pH, но также и концентрацией иммобилизованного лиганда [40]. Нейтральная протеаза является металлоферментом и поэтому ингибируется 1,10-фенантролином и

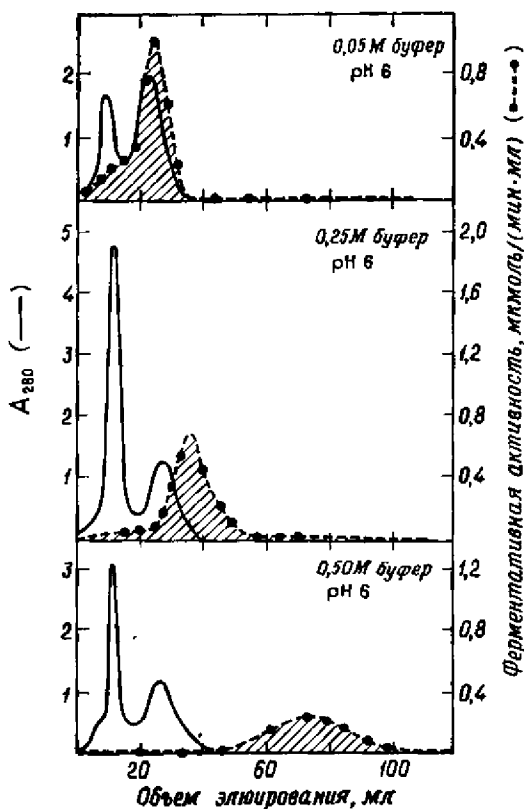


Рис. 10.3. Увеличение задержки L-гистидинолфосфатаминотрансферазы при увеличении концентрации фосфатцитратного буфера. Буферы содержали Na_2HPO_4 (в указанных концентрациях) и были доведены до pH 6,0 лимонной кислотой [35].

ЭДТА. Присутствие этих хелатирующих агентов в концентрации 1—5 мМ предотвращает сорбцию фермента на упомянутых специфических сорбентах. Влияние pH на аффинную хроматографию обсуждалось в разд. 5.6.

Следует помнить, что для сорбции данного фермента оптимальное значение pH не обязательно совпадает с оптимальным

значением pH для катализа. Касан и Ишии [22] нашли, что для сорбции трипсина на сефарозе с присоединенным глицилглициларгинином оптимальным является pH 5,6, однако это значение не является оптимальным для катализа. Следовательно, полезно определить оптимальные условия образования каждого индивидуального комплекса выделяемого вещества с иммобилизованным аффинным лигандом. Эти условия удобнее всего находить по результатам статической (одноразовой) сорбции (см. рис. 3.1, на котором показана сорбция химотрипсина на карбобензоксиглицил-D-фенилаланил-NH₂-сфере в зависимости от pH и ионной силы раствора) [38]. Из рис. 3.1 следует, что повышение ионной силы буфера приводит к снижению количества сорбированного химотрипсина. Напротив, найдено, что активный папаин не связывается на сефарозе с присоединенным глицилглицил-O-бензилтирозиларгинином при низкой концентрации солей [5]. На рис. 10.3 показана задержка выхода L-гистидинолфосфатаминотрансферазы при хроматографии на агарозе с присоединенным гистидинолфосфатом, возрастающая с увеличением концентрации фосфат-цитратного буфера [35]. Такое возрастание задержки выхода нельзя, однако, объяснить увеличением ионной силы, поскольку положение пика фермента не меняется, если ионную силу 0,05 М фосфатного буфера увеличить, добавляя раствор 0,9 М хлорида натрия. Задержка выхода фермента имеет место не только в фосфатно-цитратном буфере, но также в сульфатном или фосфатном; однако степень задержки выхода, конечно, различна. Для ряда карбоновых кислот, используемых при доведении 0,5 М гидрофосфата натрия до pH 6,0, найдено, что задержка выхода фермента возрастает с увеличением основности кислот в такой последовательности: ацетат < <сукцинат < цитрат. Ребо и др. [33] отмечают, что наиболее важными факторами, влияющими на адсорбцию белков на алкил-сефарозе, являются наряду с длиной алифатической цепи концентрация и природа присутствующих в среде солей. Важная роль солей в гидрофобной хроматографии детально рассмотрена в разд. 7.1. Влияние индивидуальных ионов на гидрофобные взаимодействия может быть выражено следующей схемой (из рекомендаций фирмы Pharmacia):

Увеличение высаливающего действия

Анионы: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- .

Катионы: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} .

Увеличение хаотропного действия

При постоянной ионной силе действие ионов на адсорбцию сильно зависит от природы ионов: некоторые из них ее уменьшают, другие увеличивают, и это скорее связано с лиотропным, чем с электро-

Таблица 10.1

Влияние ионной силы буферного раствора на сорбцию β -галактозидазы на колонке агарозы с присоединенным *п*-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозидом (колонка 114×17 мм, скорость потока $2,0 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$)

Ионная сила	Связанный белок, мР	Связанная активность, ед.	Удельная активность, ед./мг
0,010	75	6000	80
0,020	32	5500	190
0,035	14	3600	320
0,050	1,2	350	340

статическим действием. Анионы по уменьшению влияния на адсорбцию располагаются в ряд: тиоцианат=иодид>хлорид>ацетат>цитрат, который совпадает с рядом Гофмейстера для нейтральных солей [14].

Если ионная сила исходного буфера не мешает образованию аффинного комплекса, этот буфер выгодно использовать, потому что он уменьшает неспецифическую адсорбцию полиэлектролитов на заряженных группах присоединенного аффинного лиганда, возникновение которых вполне вероятно. Поэтому к буферному раствору, из которого проводят сорбцию, рекомендуется добавлять $\sim 0,5$ моль/л хлорида натрия. Влияние ионной силы на связывание β -галактозидазы на сефарозе с присоединенным *п*-аминофенил- β -D-тиогалактопиранозидом показано в табл. 10.1. С увеличением ионной силы количество сорбированного фермента уменьшается, но его удельная активность, напротив, растет [34].

Необходимость введения в раствор, из которого производится сорбция, ионов металлов или использования других специфичес-

Таблица 10.2

Влияние Mg^{2+} и АТФ на сорбцию АТРа́зы сефарозой с присоединенным ингибитором АТРа́зы^a [37]

Добавки	Нанесение АТРа́зы, нмоль/мин	Элюирование связанной АТРа́зы, нмоль/мин	Доля связанной АТРа́зы от нанесенной, %
Без добавок	336	39	12
1 мМ MgSO_4	192	35	18
0,5 мМ MgSO_4 + 0,5 мМ АТФ	678	221	33

^a Экстракт, содержащий аденозин-5'-трифосфатазу (АТРа́зу), наносился на колонку с сефарозой, содержащей ингибитор АТРа́зы, уравновешенную 0,2-М сахарозой в 15 мМ трис-ТЭС-буфере (ТЭС — N-трис-(оксиметил)метил 2-аминоэтансульфокислота) (рН 8,6); уравновешивающий буфер содержал 3 мг/мл тритона X-100, а также добавки, указанные в таблице. Количество связанного фермента рассчитывалось по результатам элюирования; состав элюирующего раствора: 0,2 М сахара́за + 45 мМ трис-ТЭС-буфер (рН 8,75) + 0,5 М KCl + 1 мМ ЭДТА + 0,3 мг/мл тритона X-100.

ких факторов проиллюстрирована в табл. 10.2. Сорбция митохондриальной АТРазы (диспергированной с тритоном X-100) на сефарозе с ковалентно связанным ингибитором зависит от присутствия ионов магния и АТР [37]. Для достижения высокой степени очистки ацетилхолинэстеразы мозга, солюбилизированной с помощью тритона, аффинную хроматографию следует проводить в присутствии тритона [9]. Занетта и Гомбос [41] проводили аффинную хроматографию мембранных гликопротеинов на конканавалин А—сефарозе в присутствии додецилсульфата натрия. Для удерживания дигидроптероатсинтетазы на сульфонамид-сефарозе необходимо присутствие дигидроптероатпирифосфата и дитиотреитола [36].

10.1.2. Практические указания для проведения сорбции

Для сорбции лучше всего образец выделяемого вещества растворять непосредственно в буфере, из которого будет производиться сорбция, и, если необходимо, проводить замену состава солей, присутствующих в образце, с помощью диализа или гель-фильтрации. Если вещество, образующее в данных условиях прочный комплекс с иммобилизованным аффинным лигандом, выделяют колоночной хроматографией, то объем образца, вводимого в колонку, может быть любым. Однако, если выделяют аффинной хроматографией вещество с низким сродством к связанному аффинному лиганду, объем наносимого образца не должен превышать 5% удерживаемого объема, для того чтобы предотвратить элюирование выделяемого вещества неадсорбированным материалом. Если выделяют вещество с низким сродством к связанному аффинному лиганду, его элюирование с колонки происходит часто даже без замены буфера. В этом случае выделяемое вещество получают в разбавленном растворе. Для иллюстрации сказанного можно сопоставить хроматографию химотрипсина на сефарозе с присоединенным метиловым эфиром ϵ -аминокапронил-D-триптофана с хроматографией этого же вещества на сефарозе с непосредственно связанным метиловым эфиром D-триптофана (рис. 5.4) [8]. Для элюирования химотрипсина с нерастворимого носителя, на котором ингибитор укреплен через ϵ -аминокапроновую кислоту в качестве пространственной группы, необходимо изменение pH, при этом фракция химотрипсина элюируется в виде острого пика. Если ингибитор присоединен непосредственно к нерастворимому носителю, его пространственная доступность понижена, и химотрипсин только замедляет свое движение через колонку. Фермент элюируется в значительно большем объеме, при том же pH, в непосредственной близости к неактивному материалу.

Если небольшие количества вещества выделяют из неочищенной смеси с помощью иммобилизованного аффинного лиганда с высоким сродством, можно очень успешно использовать сорбцию

в статических условиях (одноразовый метод), иногда в комбинации с колоночной хроматографией на стадии элюирования. В качестве примера можно привести выделение тироксинсвязывающих глобулинов с помощью аффинной хроматографии на сефарозе с присоединенным тироксином. Для того, чтобы получить более высокий выход, Пенски и Маршалл [30] проводили сорбцию в статических условиях: нормальная человеческая сыворотка в течение ночи перемешивалась с иммобилизованным аффинным лигандом. После промывки 0,1 М бикарбонатом натрия нерастворимый носитель с сорбированными выделяемыми веществами переносился в колонку, из которой затем 0,002 М едким кали элюировались две фракции тироксинсвязывающего глобулина. Такая комбинация статического и динамического (на колонке) методов часто встречается в аффинной хроматографии. Тем самым увеличивается не только время контакта выделяемых веществ с присоединенным аффинным лигандом, но и время, необходимое для точной ориентации связывающих участков. При хроматографии в колонках увеличение времени контакта выделяемого вещества с иммобилизованным аффинным лигандом достигается путем остановки на некоторое время потока через колонку после нанесения образца. Манен и Рассел [26] установили, что если в ходе аффинной хроматографии декарбоксилазы S-аденозил-L-метионина поток растворителя через колонку сефарозы с присоединенным *n*-хлормеркурибензоатом не останавливать на 2 ч, фермент будет элюироваться через несколько фракций и должная очистка не будет достигнута. Достаточно низкая скорость потока через колонку со специфическим сорбентом является наиболее важным моментом при выделении высокомолекулярных веществ, в особенности если они присутствуют в высоких концентрациях. Скорость потока, концентрация наносимого образца и время уравнивания обсуждались в разд. 5.4.

Концентрация выделяемого вещества в сорбируемом растворе влияет на скорость достижения равновесия главным образом при сорбции в статических условиях. На рис. 10.4 показаны ориентировочные опыты, проведенные Поратом и Сандбергом (см. в [32]). Порции (по 1 г) сефарозы с прикрепленным соевым ингибитором трипсина встряхивались с растворами, содержащими равные количества трипсина, но отличающимися по концентрации; измерялась остаточная активность трипсина через различные интервалы времени. Анализ полученных результатов позволил сделать вывод, что для суспензии, содержащей 1% частиц адсорбирующего 6%-ного (или менее сшитого) геля диаметром 50—100 мкм, в растворе, содержащем выделяемое вещество молекулярной массы 10 000—100 000, для сорбции необходимое время контакта с веществом составляет 20—30 мин. Объемистые белковые молекулы или частицы размером $>10^6$ дальтон требуют более продолжительного времени для диффузии к связывающим участкам аффин-

ного лиганда даже при использовании геля с высокой проницаемостью. Для веществ с гигантскими молекулами, чтобы процесс сорбции не зависел от проникновения их в гель, наиболее подходящим сорбентом является сорбент в форме шариков, покрытых веществами, которые специфически взаимодействуют с данным высокомолекулярным веществом.

Сорбция в статических условиях особенно пригодна при выделении очень больших количеств веществ, если участвующие системы

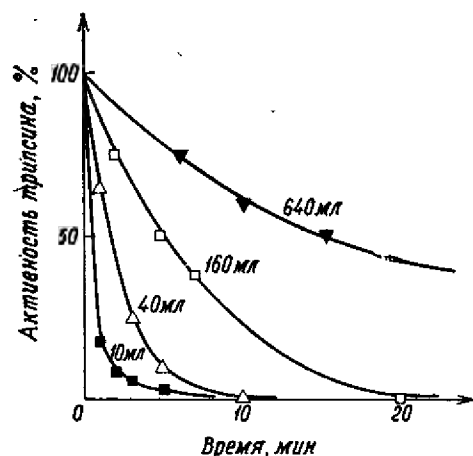


Рис. 10.4. Скорость адсорбции трипсина на частицах препарата соевый ингибитор трипсина—агароза в суспензиях, различной концентрации [32].

обладают достаточно высоким сродством. Часто полезно перед специфической сорбцией ввести предварительную стадию очистки, для того чтобы диссоциировать и отделить компоненты, находящиеся обычно в виде комплексов, содержащих требуемые вещества. Эта стадия может включать, например, осаждение, экстракцию или сорбцию на ионообменнике. Часто аффинную сорбцию проводят непосредственно из неочищенных экстрактов, сывороток или экссудатов. Порат и Кристиансен [32] рекомендуют специфические сорбенты в виде геля помещать в контейнеры с полупроницаемыми стенками, через которые могут свободно проходить растворенные вещества, но задерживаются крупные частицы. Например, этими сорбентами можно наполнять мешочки из нейлоновой сеточки. При погружении в среду нескольких мешочков, содержащих различные специфические сорбенты, можно одновременно выделить несколько веществ или же удалить из раствора нежелательные вещества, такие, как протеолитические ферменты, которые могут понижать выходы выделяемых веществ.

аемыми стенками, через которые могут свободно проходить растворенные вещества, но задерживаются крупные частицы. Например, этими сорбентами можно наполнять мешочки из нейлоновой сеточки. При погружении в среду нескольких мешочков, содержащих различные специфические сорбенты, можно одновременно выделить несколько веществ или же удалить из раствора нежелательные вещества, такие, как протеолитические ферменты, которые могут понижать выходы выделяемых веществ.

10.2. УСЛОВИЯ ЭЛЮИРОВАНИЯ

Теоретические рекомендации для освобождения выделяемых веществ из специфических комплексов с иммобилизованными аффинными лигандами обсуждались в разд. 3.1. В то время как вещества, которые не обладают сродством к присоединенному аффинному лиганду, обычно элюируются удерживаемым объемом

элюента, специфически сорбированный материал большей частью можно снять с помощью специфического элюирующего агента или путем изменения температуры или состава растворителя.

10.2.1. Практические указания для проведения десорбции

Биоспецифическое элюирование конкурентными ингибиторами применяется при выделении химотрипсина и трипсина из панкреатических экстрактов с помощью аффинной хроматографии на ага-

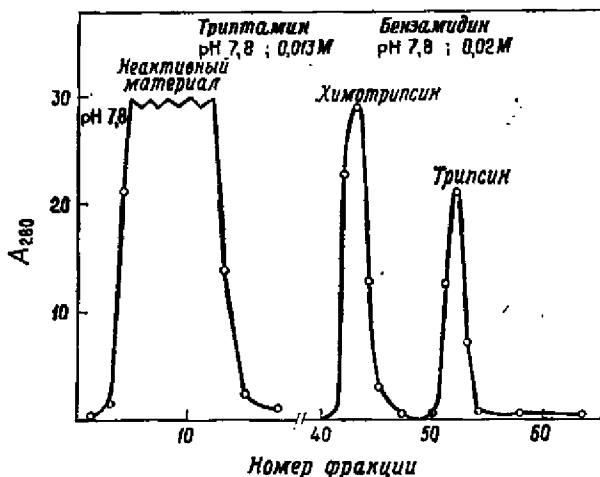


Рис. 10.5. Аффинная хроматография панкреатического экстракта на колонке с 6%-ной агарозой со связанным соевым ингибитором трипсина. Ступенчатое элюирование осуществлялось специфическими ингибиторами [31].

розе с присоединенным соевым ингибитором трипсина (рис. 10.5): химотрипсин вытесняется раствором триптамина, а трипсин — раствором бензамидина [31]. Такое элюирование является примером постадийного элюирования.

Пример градиентного элюирования специфическим элюентом приведен на рис. 10.6: нативный лизоцим, специфически сорбированный на три-(N-ацетилглюкозамин) — сефарозе, элюируется концентрационным градиентом три-(N-ацетилглюкозамина), различной крутизны [7]. Концентрационный градиент специфически элюирующего реагента всегда задавался после промывки исходным буфером. Количество наносимого на колонку фермента, параметры колонки, состав буфера и другие условия были одинаковыми для трех разбираемых случаев. Отличались только скорости изменения концентрации три-(N-ацетилглюкозамина), как это видно из рисунка. Выходы белка составляли приблизительно 90%. Лизоцим

был элюирован при всех трех градиентах при концентрации три-(N-ацетилглюкозамина) $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, что согласуется с константой ассоциации для связывания три-(N-ацетилглюкозамина) лизоцимом ($K_{\text{асс}} = 10^5$ л/моль).

Очень выгодное с теоретической точки зрения элюирование конкурентным аффинным лигандом имеет, однако, много практичес-

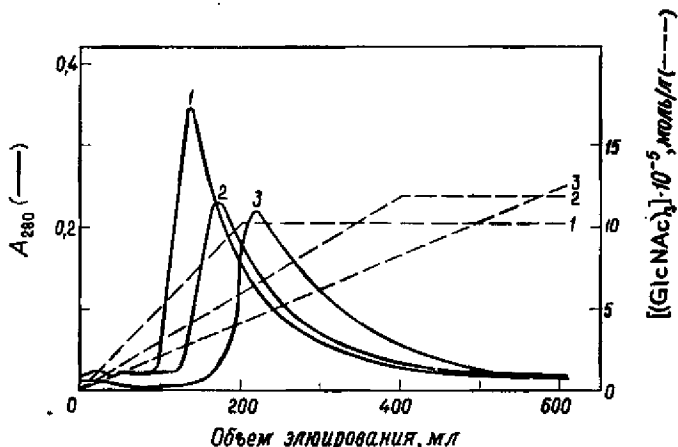


Рис. 10.6. Влияние изменяющегося градиента три-(N-ацетилглюкозамина) (GlcNAc)₃ на элюирование нативного лизоцима с три-(N-ацетилглюкозамина)-сефарозы [7].

15 мг нативного белка в 1 мл исходного буфера (0,1 М ацетат аммония, pH 7,0) было нанесено на колонку (260×17 мм). Градиенты накладывались после промывания колонки ~5 объемами колонки (5×35 мл) исходным буфером, а заканчивались 0,1 М (GlcNAc)₃ в исходном буфере. Градиенты были образованы с использованием: 1 — 100 мл исходного буфера и 100 мл конечного буфера; 2 — 200 и 200 мл; 3 — 300 и 300 мл. Скорость потока 23 мл/ч [7].

ких ограничений, обусловленных главным образом их трудной доступностью и высокой ценой. Например, лактатдегидрогеназы могут быть элюированы с N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP — агарозы относительно высококонцентрированным раствором конкурентного лиганда NADH (1,5 ммоль/л) или раствором хлорида калия средней концентрации (0,13 ммоль/л). Поэтому элюирование адсорбированных веществ путем изменения температуры, pH или ионной силы раствора используется наиболее часто.

Применение линейного градиента температуры для разделения смеси дрожевой алкогольдегидрогеназы, глицерикиназы, гексокиназы и лактатдегидрогеназы аффинной хроматографией на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе [15] показано на рис. 10.7. Интересно, что глицерикиназа и дрожжевая алкогольдегидрогеназа элюируются в порядке, предсказываемом на основе их наблюдаемых энергий адсорбции с высоким выходом (70—90%), в то время как лактатдегидрогеназа требует ударного элюирования 5 мМ

NADH даже при 40 °C. Следовательно, слабо связанные ферменты можно успешно элюировать температурным градиентом. Преимущество такого элюирования состоит в том, что элюируемые ферменты не загрязняются элюирующими реагентами (солями, нуклеотидом) и могут быть сразу использованы для кинетических исследований. Для прочно связанных ферментов температурный градиент можно применять в комбинации с другими влияющими на

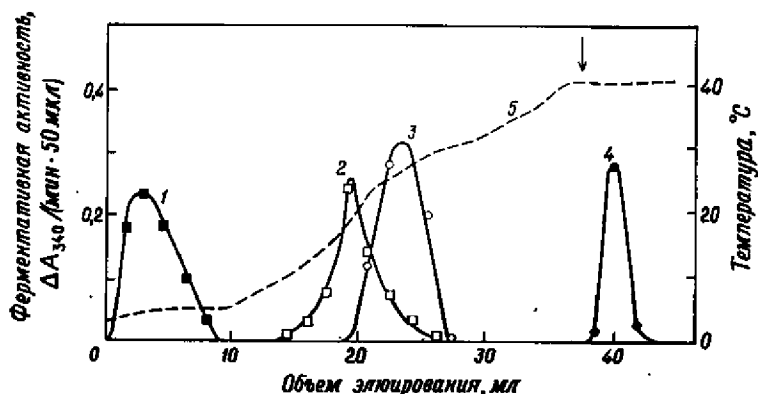


Рис. 10.7. Разделение смеси ферментов на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе с помощью градиента температуры [15].

Образец (100 мкл), содержащий 5 Е каждого фермента и бычий сывороточный альбумин (1,5 мг), наносили на колонку (50×5 мм), содержащую 0,5 г N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозу (1,5 мкмоль/мл AMP) при 4,7 °C. Колонка уравнивалась при каждой температуре в течение 5 мин перед элюированием 1,6 мл уравнивающего буфера: 10 мМ глицерин+5 мМ $MgCl_2$ +1 мМ ЭДТА+0,02% азид натрия+10 мМ трицин+KOH (pH 7,6). Момент введения «ударного» количества (200 мкл) 5 мМ NADH в уравнивающем буфере указан стрелкой. Бычий сывороточный альбумин выходил с начальными промывками колонки (0–4 мл). В элюате были обнаружены: 1 — гексокиназа; 2 — глицерокиназа; 3 — брожная алкогольдегидрогеназа; 4 — лактатдегидрогеназа. Градиент температуры (5) получали ручной доводкой циркулирующего нагревательного насоса Черчилля.

удерживание вещества факторами, такими как сорбция при низких концентрациях лигандов, ударное элюирование NADH или градиент ионной силы.

Примером использования градиента pH является разделение смеси никотинамиднуклеотид-зависимых дегидрогеназ на N^6 -(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе (рис. 10.8) [25]. Элюирование градиентом pH также позволяет получить фермент, свободный от нуклеотида и подходящий, следовательно, для использования в дальнейшем в кинетических исследованиях.

Пример использования линейного концентрационного градиента соли для выделения РНК-полимеразы из *Escherichia coli* на ДНК-агарозе [29] показан на рис. 10.9. Из фракции РНК-полимеразы, выделенной в результате предварительной стадии очистки хроматографией на биогеле А, неактивный материал отделяется аффинной хроматографией в виде первого пика, далее линейным

концентрационным (0,25—1,25 моль/л) градиентом хлорида калия выделяются две различные РНК-полимеразы.

Десорбция папаина с агарозы со связанным глицилглицил-О-бензил-L-тирозил-D-аргинином является примером элюирования путем понижения ионной силы элюирующего буфера. Бламберг и др. [5] извлекли папаин из его специфического комплекса с помощью воды.

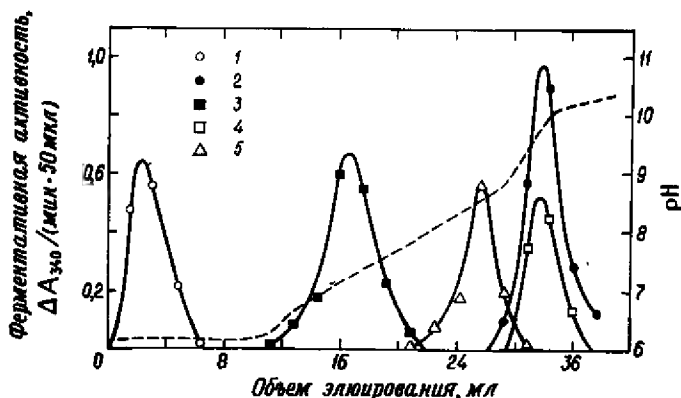


Рис. 10.8. Разделение смеси дегидрогеназ на N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозе с помощью градиента pH [25].

Смесь (100 мкл), содержащую бычий сывороточный альбумин (1,5 мг) и 5 Е каждого фермента, наносили в 10 мМ буфере (KH₂PO₄+KOH) (pH 6,0) ($\lambda=3,3$ мОМ⁻¹) на колонку (50×5 мм), содержащую 0,5 г N⁶-(6-аминогексил)-5'-AMP-сефарозы. Колонка промывалась 10 мМ уравнивающим буфером (pH 6,0) перед наложением градиента pH [pH 6—10; 10 мл уравнивающего буфера и 10 мл 30 мМ буфера (K₂HPO₄+KOH) (pH 11,0), $\lambda=6,6$ мОМ⁻¹ в приборе для линейного градиента]. 1 — бычий сывороточный альбумин; 2 — малатдегидрогеназа; 3 — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 4 — лактатдегидрогеназа; 5 — дрожжевая алкогольдегидрогеназа.

Специфический комплекс выделяемых веществ с иммобилизованным аффинным лигандом может распадаться в результате пространственного модифицирования, например, мочевиной, солями гуанидина или хаотропными ионами. Эти реагенты разрушают водородные связи или изменяют структуру воды вблизи гидрофобных областей. При использовании этих реагентов следует помнить, что компоненты комплекса могут быть необратимо разрушены при выделении. Однако известно, главным образом для иммобилизованных ферментов, что присоединение белков к нерастворимым носителям приводит к повышению стабильности. Подбирая концентрацию, температуру и время обработки, можно конформационные изменения адсорбционных участков при десорбции уменьшить до минимальных; то же самое относится и к обратимым конформационным изменениям молекул в целом как выделяемых веществ, так и иммобилизованных аффинных лигандов. На практике следует предварительно найти минимальную концентрацию, необходимую

для элюирования, определяя концентрацию и биологическую активность элюатов. Например, элюирование 1,5 и 2 М гуанидинхлоридом успешно использовалось для выделения термолизина и субтилизина соответственно после их специфической сорбции на бензилоксикарбонил-L-фенилаланилтриэтилентетраминил — сефарозе. Оба фермента в данных условиях элюирования устойчивы; получены препараты с высокой удельной активностью [11]. 6 М гуа-

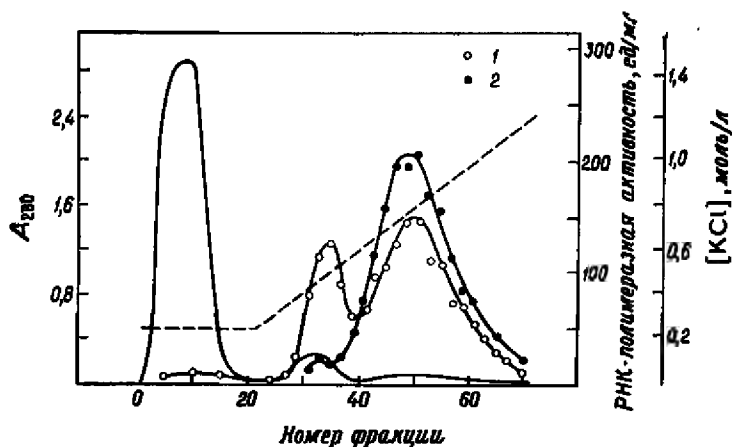


Рис. 10.9. Аффинная хроматография РНК-полимеразы на ДНК-агарозе [29]. Колонка (150×10 мм) была уравновешена стандартным буферным раствором, в котором проводилась хроматография (0,01 М трис (рН 8,0), 10^{-3} М ЭДТА, 10^{-4} М дитиозиритрол, 5%-ный глицерин), и 0,25 М хлоридом калия. Элюирование адсорбированного белка осуществляли линейным градиентом концентрации хлорида калия (600 мл, 0,25—1,25 моль/л) в стандартном буферном растворе. 95 мл раствора РНК-полимеразы наносились на колонку. Постоянная скорость потока при загрузке колонки и элюировании поддерживалась перистальтическим насосом. Фракции по 10 мл собраны и испытаны на РНК-полимеразную активность с использованием ДНК тимуса телянка (1) и ДНК T_4 (2) в качестве матриц. Общий выход РНК-полимеразной активности с колонки составлял 80%. Сплошная линия — оптическая плотность при 260 нм, пунктир — концентрации хлорида калия.

нидинхлорид при рН 1,5 также успешно использован в качестве элюирующего агента для элюирования лютеинизирующего гормона с колонки с агарозой с иммобилизованной фракцией иммуноглобулиновых антител к лютеинизирующему гормону [13]. Сразу же после элюирования рН раствора гормона доводился до 7,3 и проводился диализ раствора против 0,2 М бикарбоната аммония или 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,3), содержащего 0,9% хлорида натрия.

Хилл [17] осуществил элюирование антител с иммуносорбентов с помощью смесей диоксана со слабыми органическими кислотами. Использование шитой агарозы для приготвления иммобилизованного группового вещества крови А позволило Кристиансену [23] применить для элюирования хаотропные ионы, а именно роданид, трихлорацетат и трифторацетат. Эффективность хаотроп-

ных ионов для десорбции с иммуносорбентов была показана также Беннином и Иохансоном [3]. В связи с элюированием антител интересно наблюдение Мерфи и др. [27], касающееся увеличения аффинности антител при иммунизации. Например, антитела против глюкогона можно эффективно элюировать с иммуносорбента 4,25 М спиртом в 4 мМ соляной кислоте, однако если они были приготовлены из сыворотки того же кролика через 1 год, то для элюирования следует использовать 0,1 М уксусную кислоту, доведенную до pH 2,2 муравьиной кислотой.

Использование растворов солей для элюирования выделяемых веществ с сорбентов в гидрофобной хроматографии рассмотрено в разд. 7.1. Йеннисен и Хейлмейер [20] показали, что элюирующая способность анионов соответствует их расположению в ряду Гофмейстера и элюирующая способность катионов обратна их высаливающему или всаливающему действию. Соли способны проникать непосредственно между белком и гидрофобной поверхностью сорбента, что приводит к десорбции белка. Если за адсорбцию ответственные ионные взаимодействия, то элюирование белков должно зависеть от ионной силы раствора, но не от природы и типов используемых солей. Общие аспекты гидрофобной хроматографии, включая реагенты, применяемые для элюирования, были рассмотрены Хьертемом [18].

Если аффинный лиганд присоединен к матрице с помощью азосвязи или сложноэфирными связями тиолов или спиртов, с неразрывимой матрицы можно снять комплекс аффинного лиганда с выделяемым веществом, а затем аффинный лиганд отделить диализом или гель-фильтрацией. Этот способ, однако, не позволяет повторно использовать аффинную матрицу. Носители такого типа детально обсуждены в разделе о ковалентной хроматографии (разд. 7.2).

10.2.2. Влияние гетерогенности иммобилизованных аффинных лигандов

Когда сорбированное вещество освобождается от специфического сорбента, следует помнить о влиянии гетерогенности иммобилизованного аффинного лиганда [1]. На рис. 10.10 приведены результаты выделения химотрипсина и трипсина из гомогенатов поджелудочной железы мыши на различных препаратах сефарозы с присоединенным соевым ингибитором трипсина. Если допустить, что различия в условиях элюирования отражают различия в биологической активности, картина элюирования может использоваться для характеристики молекулы. Применимость сорбента, таким образом, зависит от функциональной гомогенности иммобилизованного аффинного лиганда.

Гетерогенность сорбента по константам ассоциации может быть следствием: 1) гетерогенности биоспецифического лиганда, исполь-

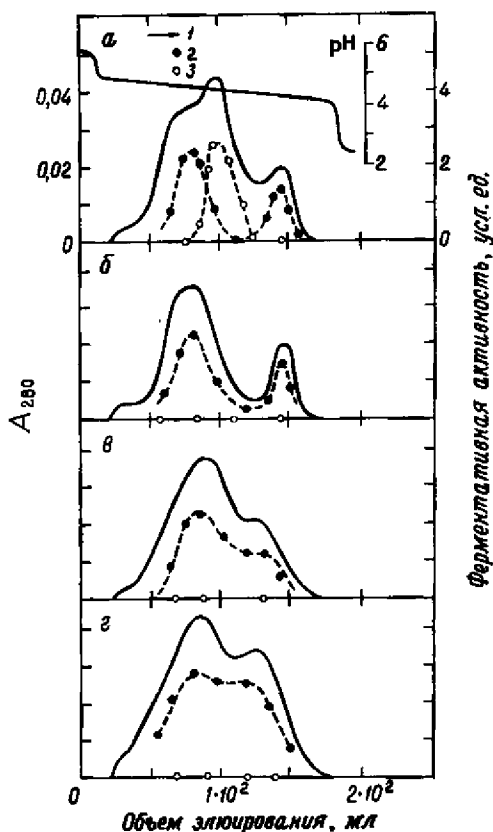


Рис. 10.10. Разделение химотрипсина мышей на сепарозе 4В, замещенной различными препаратами соевого ингибитора трипсина [1].

1 — A_{280} или pH; 2 — химотриптическая активность; 3 — триптическая активность. а — немодифицированный препарат Worthington ингибитор-сепароза, присоединенный при pH 7.2; б — тот же препарат, модифицированный химотрипсином; в — тот же препарат, что и на рис. б, но присоединенный при pH 8.5; г — химотрипсином модифицированный препарат Sigma ингибитор-сепароза, присоединенный при pH 7.2.

зусмого для получения сорбента; 2) различных изменений лиганда под влиянием иммобилизации; 3) различных изменений аффинного лиганда, вызываемых молекулами, присутствующими в фракционируемой смеси.

Гетерогенность лиганда, используемого для иммобилизации

Высокомолекулярные аффинные лиганды биологической природы, такие, как белки, нуклеиновые кислоты и углеводы, используемые для приготовления специфического сорбента, могут быть генетически неоднородны; такая гетерогенность может быть обнару-

жена и в продажных, и других препаратах лигандов. Очевидно, что присутствие в иммобилизованных аффинных лигандах примесей, обладающих таким же или более сильным сродством к выделяемым молекулам, может ухудшать полезность специфического сорбента при градиентных separations.

Изменения аффинного лиганда при иммобилизации

Эффективная активность лиганда под влиянием иммобилизации может меняться самым различным образом. На взаимодействие иммобилизованного лиганда с выделяемыми молекулами может оказывать значительное очень разнообразное влияние микроокружение, образуемое матрицей (плотность заряда, стерические препятствия и т. д.); оно же может также влиять и на структуру аффинного лиганда. Иммобилизация приводит также к изменениям в химической структуре, которые различным образом изменяют его молекулярные свойства. Так, например, существенную роль играет число связей между аффинным лигандом и нерастворимым носителем. Из сопоставления результатов, представленных на рис. 10.10, *б* и *в*, следует, что неблагоприятное влияние возрастающего числа связей между молекулами соевого ингибитора трипсина и сефарозой 4В вызвано увеличением pH с 7,2 до 8,5 во время связывания белка после активации бромцианом.

Изменения аффинного лиганда после иммобилизации

Фракционируемый материал может содержать компоненты, которые изменяют активность присоединенного аффинного лиганда. Эти компоненты могут быть близки выделяемым соединениям, хотя это и не обязательно. Ферменты, например протеиназы и нуклеазы, присутствующие в неочищенных экстрактах, могут расщеплять присоединенные аффинные лиганды (белки, нуклеиновые кислоты) и тем самым уменьшать емкость сорбента для связывания специфически комплементарного соединения. Кроме такой неспецифической деградации аффинного лиганда ферменты и другие химические соединения, присутствующие в фракционируемой смеси, могут специфически модифицировать свойства присоединенного аффинного лиганда, приводя к образованию форм с сохраненной, но измененной активностью.

На рис. 10.10 можно проследить все три отмеченных выше эффекта. Соевый ингибитор трипсина, поставляемый фирмами Worthington Biochem. Co. и Sigma был присоединен к сефарозе, активированной бромцианом. Присоединенный ингибитор затем модифицировался раствором химо трипсина: колонка с сорбентом промывалась раствором химо трипсина при pH 8 со скоростью потока 10 мл/ч в течение 24 ч и после инкубации химо трипсин элюировался буфером с pH 2,5. Из рис. 10.10, *а* следует, что при использовании немодифицированного препарата ингибитор (Worthington) —

Таблица 10.3

**Условия элюирования химотрипсина I и химотрипсина II мышей
на модифицированном химотрипсином препарате ингибитор
(Worthington)—сефароза, иммобилизованном при pH 7,2**

Количество поджелудочных желез, взятых для получения экстрактов, нанесенных на колонку	Активность несвязавшегося химотрипсина, %	pH раствора химотрипсина	
		в пике I	в пике II
0,5	0	4,75	4,30
1	0	4,90	4,35
2	3	5,05	4,50
4	57	>5,10	4,80

сефароза, полученного иммобилизацией при pH 7,2, наблюдалось плохое разделение двух пиков с химотриптической активностью и пика с триптической активностью. Два других пика с триптической активностью элюировались значительно позднее при более низких pH. После обработки этого препарата сорбента раствором химотрипсина элюирования триптической активности одновременно с химотриптической больше не происходило. В то же время наблюдалось хорошее разделение двух пиков с химотриптической активностью. Если для разделения применялся препарат ингибитор (Worthington)—сефароза, приготовленный иммобилизацией при pH 8,5 и модификацией раствором химотрипсина, разделение двух пиков с химотриптической активностью значительно ухудшалось, также ухудшалось разделение при использовании препарата ингибитор (Sigma)—сефароза, полученного иммобилизацией при pH 7,2 (рис. 10.10, з).

Если фракционировались разные количества активированного панкреатического гомогената на модифицированном препарате ингибитор (Worthington)—сефароза, полученном при pH 7,2, то увеличение нагрузки колонки приводило к тому, что пики с химотриптической активностью элюировались при более высоких значениях pH (табл. 10.3) и хуже разделялись. Емкость геля составляла 9 мг/мл. После разделения девяти проб панкреатических гомогенатов его емкость падала до 0,2 мг/мл.

10.2.3. Установление оптимальных условий и эффекта насыщения

Для нахождения оптимальных условий Порат и Кристиансен [32] рекомендуют предварительными экспериментами определить емкость колонки. Это определение лучше всего может быть осуществлено фронтальной хроматографией на колонке с общим объемом в несколько миллилитров. Измеряют поглощение элюатов при подходящей длине волны в УФ-области, собирая небольшие

фракции. В каждой фракции определяют активность и рассчитывают емкость по активности, задержавшейся на колонке. Кроме того, фронтальная хроматография может также обеспечить информацией о возможном присутствии нескольких компонентов с идентичным сродством, но различными объемами, при которых они элюируются. Иногда могут быть определены одновременно две активности, например трипсина и химотрипсина, при элюировании с колонки с иммобилизованным соевым ингибитором трипсина. Данные, полученные в предварительных экспериментах, имеют ценность для планирования главного эксперимента, который должен привести к максимальной очистке на колонке с заданным объемом используемого сорбента.

В некоторых случаях обнаружено, что при использовании свежеприготовленных сорбентов теряется часть активности выделяемого вещества, вероятно, из-за его необратимой сорбции. Так, Горецкий и др. [12] описали изменчивость конъюгата пенициллин—сефароза. *n*-Аминобензилпенициллин, присоединенный к сефарозе бромциановым методом, дает очень устойчивый конъюгат, который сохраняет свою способность специфически адсорбировать D-аланинкарбоксипептидазу даже после хранения в воде в присутствии 0,02% азида натрия при 4 °C в течение нескольких месяцев. Однако найдено, что только ~60% всех препаратов этого сорбента пригодны для немедленного использования в аффинной хроматографии D-аланинкарбоксипептидазы, т. е. некоторые конъюгаты необратимо сорбируют ферменты и никакой ферментативной активности не удается элюировать, даже используя высокие концентрации солей. Насыщение геля неочищенным ферментом (для чего берется ~10-кратный избыток фермента по сравнению с используемым для обычной очистки) превращает пенициллин—сефарозу в нормальный обратимый сорбент, пригодный для аффинной хроматографии D-аланинкарбоксипептидазы. Этот эффект насыщения высоко специфичен, и никакой другой инертный белок, например бычий сывороточный альбумин, не может заменить D-аланинкарбоксипептидазу в необратимой сорбции. Кроме того, показано, что при хранении гелей при 4 °C некоторые из них, характеризующиеся необратимой сорбцией, превращались в сорбенты, пригодные для нормальной аффинной хроматографии. Это можно объяснить уменьшением числа высокоактивных сорбирующих центров на поверхности геля, вследствие чего связывание фермента этими модифицированными специфическими сорбентами становится обратимым.

10.3. НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ СОРБЦИЯ

Неспецифическая сорбция уже обсуждалась на ряде примеров (разд. 5.1, 5.8, 7.1 и 8.3). С одной стороны, она мешает аффинной хроматографии, основанной на образовании биоспецифического

комплекса, а с другой — увеличивает аффинность систем со слабым родством (составная аффинность). Она создает возможность осуществления разделений на основе взаимодействия участков с гидрофобной поверхностью макромолекул, так называемой гидрофобной хроматографии, которая может быть сравнена с такими общими методами, как ионообменная хроматография или гель-фильтрация. Наиболее часто используемыми сорбентами в гидрофобной хроматографии являются агарозы, к которым после активации бромцианом присоединены алкиламины. Йост и др. [21] показали, однако, что при присоединении алкил- или ариламинов к агарозе, активированной бромцианом, образуются сильные ионообменники с кажущимся $pK \sim 10$ для амидинового азота. Используя заряженные гидрофобные лиганды, получают сорбенты, которые функционируют как детергенты, прочно сорбирующие некоторые ферменты, которые частично денатурируют при выделении. Выяснение способа прикрепления амина к бромциан-активированной агарозе (образуется изомочевинная связь) приводит к объяснению части наблюдаемой неспецифической сорбции ряда соединений [28].

Нативная сефароза или сефароза, блокированная этаноламином сразу же после активации бромцианом, не адсорбируют белки [16]. Однако, если сефароза не блокирована тотчас же после активации, наблюдается неспецифическая сорбция белков, которая становится тем сильнее, чем больше проходит времени между активацией бромцианом и блокированием активных центров. Препарат человеческий сывороточный альбумин—сефароза, блокированный после 12 ч после присоединения сывороточного альбумина, сорбирует только 0,4 мг белка на 1 мл геля.

Хейнцель и др. [16] описали подавление неспецифической адсорбции белка на препарате человеческий сывороточный альбумин—сефароза путем нейтрализации основных уретановых групп (которые возникают из аминокарбонатных групп, образуемых главным образом при присоединении сывороточного альбумина к сефарозе) анионным красителем голубым декстраном 2000. Иммуносорбент, приготовленный этим способом, сорбировал 0,7—1,0 мг белка на 1 мл геля в колонке, в то время как выделенное антитело было чистым и сохраняло свои нативные свойства. Лорнитцо и др. [24] описали неспецифическое (ионное) связывание субъединиц синтетазы жирных кислот на специфическом сорбенте, приготовленном путем присоединения пантетеина к ϵ -аминокапронил—сефарозе с использованием больших количеств карбодимида (этилдиметиламино- n -пропилкарбодимида).

Хофсти [19] провел подобное же исследование, касающееся неомогенности и необратимости связывания белков на сорбентах, таких, как сефарозы, замещенные n -алкиламинами или 4-фенил- n -бутиламином. Например, на колонку (2 мл) сефарозы с присоеди-

ненным *n*-бутиламиноом наносился 0,1%-ный раствор альбумина в 0,001 М трис-НСl-буфере, рН 8, до насыщения колонки. Нагруженная колонка содержала ~30 мг белка (при 5°C). Приблизительно третья его часть элюировалась тем же самым буфером, но почти 20 мг белка оставались связанными, несмотря на интенсивную промывку, и могли быть отмыты, только когда возрастала ионная сила элюирующего раствора. Часть оставшегося на колонке белка отмывается 0,01 М трис-НСl-буфером, однако большая часть белка отмывается 0,01 М трис-НСl-буфером, содержащим 0,1 моль/л хлорида натрия, и очень небольшое количество белка — 0,1 М трис-НСl-буфером, содержащим 1,0 моль/л хлорида натрия. Эти результаты указывают на то, что часть белка освобождается на каждом уровне ионной силы раствора, в то время как остальная часть остается необратимо связанной в данных условиях. Подобное разделение на фракции достигалось также при градиентном элюировании раствором хлорида натрия. «Фракционирование» одного и того же белка Хофсти объясняет негомогенностью связывающих центров адсорбента. Это предположение согласуется с результатом, полученном при хроматографии 2 мг овальбумина на той же колонке в идентичных условиях. Элюирование этого небольшого количества белка при помощи градиента ионной силы (хлорид натрия) происходит растворами с концентрацией соли, соответствующей элюенту, снимающему с колонки последние остаточные количества прочно адсорбированного белка, в случае, когда на колонку наносилось большое количество овальбумина. Эти результаты означают, что некоторые «сильно-связывающие» центры занимаются белком в первую очередь и что некоторые другие участки с пониженной аффинностью занимаются при нанесении на колонку большего количества белка. Аналогично явлениям, наблюдаемым при элюировании растворами с различной ионной силой, с сорбентов с сильными гидрофобными группами только часть белка может быть элюирована соевым раствором (хлорид натрия) даже в такой высокой концентрации, как 1 моль/л, остающаяся часть белка снимается только при добавлении в элюент агента, уменьшающего полярность (например, этиленгликоль). Такие же результаты были получены и для других белков и красителя понсо S. Из этого следует, что при нанесении на колонку небольших количеств белков они связываются со специфическими сорбентами более гомогенно, чем при нанесении больших. Это может означать, что уменьшение количества наносимого белка способствует использованию преимущественно одного типа связывающих центров адсорбента.

Если многоточечное связывание является одной из причин сильного неспецифического связывания, то одним из способов понижения последнего могло бы быть уменьшение степени замещения так, чтобы расстояния между отдельными молекулами аффин-

ного лиганда были больше диаметра молекул выделяемого вещества. Это, однако, не должно оказывать влияния на специфическое взаимодействие молекулы вещества с молекулой лиганда, например активного центра фермента с иммобилизованным субстратным аналогом. Другой способ уменьшения неспецифической сорбции,— предотвратить образование зарядов и гидрофобных участков в иммобилизованных аффинных лигандах (разд. 5.1 и 8.3).

10.4. РЕГЕНЕРАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ АФФИННЫХ КОЛОНОК

Наиболее общим методом регенерации колонок для повторного использования является промывка их либо щелочными, либо кислыми буферными растворами, подобно тому как это делается при приготовлении колонок. Например, сефароза со связанным глицил-D-фенилаланином после выделения нейтральной протеиназы из *Bacillus subtilis* отмывалась буфером (рН 9), объем которого равен двум объемам колонки, а затем другим буфером (рН 5 или 7), и окончательно вновь колонка уравнивалась буфером, используемым для аффинной хроматографии [40]. Колонки, регенерированные таким образом, не меняют своих хроматографических свойств даже после 50 рабочих циклов. Бенсон и др. [4] использовали промывание 6 М гуанидинхлоридом и повторное уравнивание исходным буфером для регенерации 19-нортестостерон-17-О-сукцинилдиаминодипропиламиноагарозы. Туркова и др. [38, 39] также использовали 6 М гуанидинхлорид для регенерации специфических сорбентов.

После экспериментов, включающих элюирование детергентами, фирма Pharmacia рекомендует проводить следующую процедуру промывки для регенерации сорбентов, используемых в гидрофобной хроматографии (объемы соответствуют объему колонки):

- 1) промыть 1 объемом дистиллированной воды, затем 1 объемом спирта;
- 2) промыть 2 объемами *n*-бутанола;
- 3) промыть 1 объемом спирта, затем 1 объемом дистиллированной воды;
- 4) вновь уравновесить гель исходным буфером; колонка готова к следующему опыту.

Скорость потока в ходе промывок может быть такой же или выше, чем используется при хроматографии; считается подходящей скорость 25—50 см/ч.

Нерастворимый аффинный лиганд, особенно если это белок, часто более стабилен, будучи связанным с нерастворимым носителем, чем в свободном виде. Во многих случаях для сохранения активности лучше всего хранить специфические сорбенты после

подсушивания на воронке с отсасыванием при низкой температуре в присутствии подходящего бактерицидного агента (например, 0,02% азида натрия). Выбор буфера для хранения зависит от свойств связанного аффинного лиганда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amneus H., Gabel D., Kasche V., J. Chromatogr., 120, 391—397 (1976).
2. Andria G., Taniuchi H., Cone J. L., J. Biol. Chem., 246, 7421—7428 (1971).
3. Bennich H., Johansson S. G. O., Advan. Immunol., 13, 1—55 (1971).
4. Benson A. M., Suruda A. J., Shaw R., Talalay P., Biochim. Biophys. Acta, 348, 317—320 (1974).
5. Blumberg S., Schechter I., Berger A., Eur. J. Biochem., 15, 97—102 (1970).
6. Caron M., Faure A., Cornilloy P., Anal. Biochem., 70, 295—301 (1976).
7. Cornelius D. A., Brown W. H., Shrake A. F., Rupley J. A., Methods Enzymol., 34, 639—645 (1974).
8. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 61, 636—643 (1968).
9. Dawson R. M., Crone H. D., J. Chromatogr., 92, 349—354 (1974).
10. Edgington T. B., J. Immunol., 106, 673—680 (1971).
11. Fujitwara K., Osue K., Tsuru D., J. Biochem. (Tokyo), 77, 739—743 (1975).
12. Gorecki M., Bar-Eli A., Patchornik A., Methods Enzymol., 34, 398—401 (1974).
13. Gospodarowicz D., J. Biol. Chem., 247, 6491—6498 (1972).
14. Green A. A., J. Biol. Chem., 93, 495—516 (1931).
15. Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 353—357 (1974).
16. Heinzel W., Rahimi-Laridjani I., Grimminger H., J. Immunol. Methods, 9, 337—344 (1976).
17. Hill R. J., Immunol. Methods, 1, 231—245 (1972).
18. Hjerstén S., J. Chromatogr., 87, 325—331 (1973).
19. Hofstee B. H. J., Advan. Exp. Med. Biol., 42, 43—59 (1974).
20. Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G., Jr., Biochemistry, 14, 754—760 (1975).
21. Jost R., Miron T., Wilchek M., Biochim. Biophys. Acta, 362, 75—82 (1974).
22. Kasai K., Ishii S., J. Biochem. (Tokyo), 77, 261—264 (1975).
23. Kristiansen T., Biochim. Biophys. Acta, 338, 246—253 (1974).
24. Lornitzo F. A., Qureshi A. A., Porter J. W., J. Biol. Chem., 249, 1654—1656 (1974).
25. Lowe C. R., Harvey M. J., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 347—351 (1974).
26. Manen C. A., Russell D. H., Life Sci., 14, 1907—1915 (1974).
27. Murphy R. F., Imam A., Hughes A. E., McGucken M. J., Buchanan K. D., Conlon J. M., Elmore D. T., Biochim. Biophys. Acta, 420, 87—96 (1976).
28. Nishikawa A. H., Bailon P., Arch. Biochem. Biophys., 168, 576—584 (1975).
29. Nüsslein C., Heyden B., Biochem. Biophys. Res. Comm., 47, 282—289 (1972).
30. Pensky J., Marshall J. S., Arch. Biochem. Biophys., 135, 304—310 (1969).
31. Porath J., Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3, 145—166 (1972).
32. Porath J., Kristiansen T., in: The Proteins, H. Neurath, R. L. Hill (Eds.), Academic Press, New York, 3rd ed., 1975, pp. 95—178.
33. Raibaud O., Högborg-Raibaud A., Goldberg M. E., FEBS Lett., 50, 130—134 (1975).
34. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D., Biochim. Biophys. Acta, 285, 28—35 (1972).
35. Shaltiel S., Henderson G. B., Snell E. E., Biochemistry, 13, 4330—4335 (1974).

36. Suckling C. J., Sweeney J. R., Wood H. C. S., Chem. Comm., 1975, 173—174.
37. Swanljung P., Frigeri L., Biochim. Biophys. Acta, 283, 391—394 (1972).
38. Turková J., Bláha K., Valentová O., Čoupek J., Seifertová A., Biochim. Biophys. Acta, 427, 586—593 (1976).
39. Turková J., Vavreinová S., Kriváková M., Čoupek J., Biochim. Biophys. Acta, 386, 503—508 (1975).
40. Walsh K. A., Burstein Y., Pangburn M. K., Methods Enzymol., 34, 435—440 (1974).
41. Zanetta J. P., Gombos G., FEBS Lett., 46, 276—278 (1974).

Примеры применения аффинной хроматографии

Области применения аффинной хроматографии расширяются, поскольку метод основан на специфических взаимодействиях биологически активных веществ. Как видно из табл. 11.1, этот метод успешно используется при выделении самых разных соединений. Наряду с этим он полезен при изучении различных систем; на аффинных сорбентах можно разделять низкомолекулярные энантимеры и удалять нежелательные вещества из живых организмов. Например, аффинной хроматографией можно разделить на оптические антиподы D,L-триптофан. Используя специфическое выделение меченых пептидов, можно определить пептиды активного центра фермента, связывающего участка антител или участка пептидных цепей на поверхности молекулы. Аффинная хроматография может быть использована для изучения возможности замены природных пептидных цепей ферментов различными модифицированными синтетическими пептидами. Активные центры ферментов или антител, связывающие свойства субъединиц, специфичность ферментов по отношению к различным ингибиторам, комплементарность нуклеиновых кислот, взаимодействие нуклеотидов с пептидами, влияние присутствия различных соединений на образование специфических комплексов и т. д. могут быть исследованы с помощью аффинной хроматографии.

Проблемы механизма ферментативной активности могут быть изучены на основании данных аффинной хроматографии. Такие данные позволяют высказать суждение о молекулярных структурах, например, интерферонов фибробластов или лейкоцитов. Исследовались также возможности аффинной хроматографии для удаления нежелательных веществ из крови живых организмов.

Области применения аффинной хроматографии многочисленны и разнообразны и не ограничиваются только теми, которые перечислены выше. В последующих разделах рассмотрены некоторые примеры, иллюстрирующие возможности аффинной хроматографии.

Использование аффинной хроматографии для выделения биологически активных веществ

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Антитела			
Антитело анти-А	Вещество А	Сефароза 2В, сманная 2,3-дигром-пропанолом	656
Сывороточное антитело анти-А (человека)	Групповое вещество крови А	Сефароза 2В с лизином или аминоксилотами	657
Сывороточные антитела анти-А и анти-В	Очищенные групповые вещества крови	Очищенные групповые вещества крови, сополимеризованные с N-карбонил-этил-этилендиамидом L-лейцина	612
Антитела	Антигены	Ионообменные смолы	571
		Сополимеры этилена и малеинового ангидрида	180
— против аденозин-5'-монофосфата	Олигоадениловые кислоты	Биогель Р-300	1167
— — адренокортикотропного гормона (АКТГ)	Синтетический фрагмент $\alpha(1-24)$ АКТГ	Сефароза 4В с 6-аминогексановой кислотой	291
— — белков миеломы 315 и 460	Белок 315 и 460	ВгСN-активированная сефароза 4В	749
— — амилоидного белка фибрил	Амилоидный белок фибрил	Сефароза	1077
— — ангиотензина II	Ангиотензин II	Сефароза 4В	720
— — ангиотензина II β -амида	Ангиотензин II	Сефароза 4В с сывороточным альбумином	81
— — аполипротеина А-1	Аполипротеин А-1	Сефароза 4В	549
— — п-азобензоларсоната	п-(п-Аминобензолазо) бензоларсоновая кислота	То же	344
	п-Аминобензоларсоновая кислота	Целлюлоза	698
		Нерастворимый полимер кроличьего сывороточного альбумина или γ -глобулина	870
— — п-азофенил- β -галактозида	Антиген	Сефароза	1292
		»	1292

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— — <i>p</i> -азофенил- β -глюкуронида			1292
— — <i>p</i> -азофенил- β -лактозида			1292
— — базальной мембраны		Антиген, сополимеризованный с акриламидом	765
— — бычьего γ -глобулина	Ацетат ртути(II)	Сефароза 4В	1010
		Целлюлоза с 1-аллилокси-2,3-эпокси-пропаном	1047
— — бычьего сывороточного альбумина	Антиген	КМ-целлюлоза	1263
		Бромацетилцеллюлоза	957
	Бычий сывороточный альбумин (БСА)	<i>p</i> -Аминобензилцеллюлоза	168
		КМ-целлюлоза	1258
		Целлюлоза	93
		БСА, сшитый глutarальдегидом (нерастворимый)	631
		Антиген, сополимеризованный с акриламидом	765
— — κ -, λ -, α -цепей из иммуноглобулинов	κ -, λ - или α -цепи	Сефароза	804
— — γ G-, γ A- и γ M- и κ - и λ -цепей (человека)	Антигены	Сефароза 4В	756
— — легкой цепи b5	Легкая цепь b5 (из кроличьего иммуноглобулина)	Сефароза 2В	943
— — проколлагена сухожилия цыпленка	Аминоконцевые фрагменты проколлагена	Сшитые глutarальдегидом	265
— — клонового иммуноглобулина (IgG)	Клоновый IgG, сополимеризованный с бычьим сывороточным альбумином (с использованием глutarальдегида)	Биогель Р-300	1108
— — декстрана	Нерастворимый декстран	Сефадекс	958
— — динитрофенильной группы (ДНФ)	2,4,6-Тринитробензолсульфокислота	Целлюлоза	198

	Тринитрофенилированный сывороточный альбумин	Бромацетилцеллюлоза	584, 957
— — — — из кроличьей сыворотки	Антиген	Сефароза	1292
— — — — с высоким сродством	Тринитрофенилированный бычий γ -глобулин	Бромацетилцеллюлоза	1260
— — — — с низким сродством	Динитробензолсульфокислота	Сефароза 2В	347
— — дифтерийного токсина	Антиген	Биогель Р-300 с этилендиамином	347
— — ДНК	ДНК	Бромацетилцеллюлоза	957
		Целлюлоза	1163—
— — β -экдизона	β -Экдизон	Эпоксифункционированная сефароза 6В	1166
— — яичного альбумина	Антиген	Аминоцеллюлоза	991
— — эритроцитов	Эритроциты	Сферон 300	815
— — эритропоэтина	Человеческий эритропоэтин мочи	Сефароза 4В	1177
— — ферритина	Ферритин	ВгСN-активированная сефароза 4В	554
		Антигены, иммобилизованные в агарозе с помощью сшивания глutarальдегидом	635
— — фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)	Человеческий хорионовый гонадотропин (ЧХГ)	Сефароза 4В	418
— — гиббереллиновой кислоты	Гиббереллиновая кислота, конъюгированная с бычьим сывороточным альбумином	То же	1006
— — глобозида	Глобозид		394
— — γ -глобулина	γ -Глобулин	Аминоэтил-сефароза	672
		Антигены, иммобилизованные в агарозе с помощью сшивания глutarальдегидом	418
— — глюкагона	Модифицированный глюкагон	ВгСN-активированная сефароза 4В	825
— — глюкозооксидазы	Глюкозооксидаза	Сефароза 4В	1218
— — глутаматдегидрогеназы	Глутаматдегидрогеназа (митохондриальная)	ВгСN-активированная сефароза	280
— — стрептококкового полисахарида группы А	л-Ампиофенил- β -N-ацетилглюкозаминид	Сефароза	891
— — гормона роста	Гормон роста (быка или человека)	Сефароза 4В	358
— — гематозида	Гематозид	Стеклянные шарики, несущие аминоксигруппы	672
— — гистона H1	Гистон H1	ВгСN-активированная сефароза	166
— — человеческого γ -глобулина	Антиген	KM-целлюлоза	1263

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— кроличьего γ -глобулина	Человеческий γ -глобулин	Стекло	1257
— человеческого гонадотропина	Антиген	Антиген, сополимеризованный с акриламидом	765
— человеческого гормона роста	Человеческий гормон	Дивинилсульфонил-сефароза 6В	994
— человеческого гемоглобина A_1	Гемоглобин A_1 либо α - или β -цепи	BrCN-активированная сефароза 4В	1155
из сыворотки козы			
— человеческого иммуноглобулина	Антиген	Антиген, сополимеризованный с акриламидом	765
— человеческого иммуноглобулина G	Человеческий иммуноглобулин G	Ультрагель	455
— человеческого гипотизарного пролактина	Человеческий гипотизарный пролактин	Сефароза 4В	552
— человеческого плацентарного лактогена	Человеческий плацентарный лактоген	Сефароза 4В	462
— человеческого сывороточного альбумина	Антиген	Амино-целлюлоза	815
	Фрагмент человеческого сывороточного альбумина, называемый ингибитором	<i>l</i> -Аминобензилцеллюлоза	1255
	Человеческий сывороточный альбумин	Бромацетилцеллюлоза или сефароза 4В	500
	Человеческий сывороточный альбумин с голубым декстрановым красителем	Сферон 300	1177
		Сефароза 4В	493
— инсулина	Инсулин	Нерастворимый полимер кроличьего сывороточного альбумина или γ -глобулина	870
		Сефароза	239
		Сефароза 4В, сферон Р-300 и их производные с гексаметилендиаминном	1076

— — интерферона	Интерферон	BrCN-активированная сефароза 4В	468
— — гемоглобина фиссуреллы	Антиген	Сефароза 4В	1010
— — α -лактальбуминов человеческого, коровьего, козьего и овечьего молока	α -Лактальбумин	То же	925
— — D-лактатдегидрогеназы	D-Лактатдегидрогеназа	» »	1065
— — лейцинамниопептидазы	Лейцинамниопептидаза	Сефароза 6В	682
— — липида А	Липид А	Сефароза 4В	741
— — липовителлина	Липовителлин	Сефароза	263, 1265
— — лизергида из овечьей антисыворотки	D-Лизергиновая кислота	Агароза с длинноцепочечным гидразидным производным	730
— — лизинвазопрессина	(8-Лизин)-вазопрессин	Сефароза 4В	377
— — (8-лизин)-вазопрессина из кроличьей антисыворотки	То же	Сефароза 4В или сферон Р-300	1219
— — лизоцима	Лизоцим, сополимеризованный с бычьим сывороточным альбумином (с помощью глутаральдегида)	Биогель Р-300	1108
— — морфина	Антигены	Бромацетилцеллюлоза	957
— — белков мнеломы	6-Сукцинилморфин	АН-сефароза 4В	1073
— — многоглобина	Антигены	Сефароза	1292
	Многлобин	АЭ-, БА-, КМ-целлюлоза, ЭМА или сефароза 4В	133
— — 3-нитро-4-окси-5-иодфенилацетила	3-Нитро-4-окси-5-иодфенилацетилэтилендиамин	Сефароза 4В	519
— — нитротирозина	Нитро- γ -глобулин	Сефароза	494
— — овальбумина	Овальбумин	Овальбумин, сшитый глутаральдегидом	883
— — овечьего промежуточного клеток стимулирующего гормона (ПКСГ)	ПКСГ	Дивинилсульфонил-сефароза 6В	994
— — овотрансферрина	Овотрансферрин	Овотрансферрин и бычий сывороточный альбумин, сополимеризованные хлоруглеродным эфиром	348
— — папаина	Антиген	Бромацетилцеллюлоза	957
— — пероксидазы	»	Биогель Р-300 с глутаральдегидом	1167
— — свиной лактатдегидрогеназы типа V (ЛДГ V)	ЛДГ V	Сефароза 4В	500

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— — пневмококковых полисахаридов	Конъюгат SB бычьего γ -глобулина	Сефароза 4B	197
— — полипептидов и их конъюгатов	Антиген	Бромацетилцеллюлоза	957
— — белковых гормонов (овечьего и человеческого промежуточных клеток стимулирующего гормона, β -субъединицы и гипофизарного пролактина крысы)	Белковые гормоны	Дивинилсульфонил-сефароза 4B	995
— — кроличьего γ -глобулина	Антиген	Антиген, сополимеризованный с акриламидом	765
— — кроличьего и человеческого иммуноглобулинов (IgG)	"	Биогель P-300 с глутаральдегидом	1167
— — «малик»-фермента печени крысы	«Малик»-фермент печени крысы	Сефароза 4B	376
— — резуса и человеческих лимфоцитов	Строма резус лимфоцитов	Сефадекс G-100	1289
— — рибонуклеазы	Рибонуклеаза	Бромацетилцеллюлоза	957
— — агглютиниона кастанки	Агглютинин кастанки	Сефароза 4B	556
— — сывороточного альбумина	Сывороточный альбумин (человека и быка)	BtCN-активированная сефароза 4B	864
		Полистирол	463, 464
— — овечьего иммуноглобулина G	Овечьего иммуноглобулина G	Целлюлоза	440
— — серповидного гемоглобина	Синтетический пептид, соответствующий первым 13 аминокислотным остаткам β -цепи серповидного гемоглобина	Ультрагель	455
		Сефароза 2B	1318
— — стафилококковой нуклеазы	Нуклеаза из <i>Staphylococcus aureus</i>	Сефароза 4B	867
— — тиротропина	Тиротропин	То же	1159
— — токсина α_1	Токсин α_1 из <i>Naja nigricollis</i>	"	272
— — трипсина	Трипсин	Биогель P-300 с глутаральдегидом	1167
Антитела из кроличьей антигаптенной сыворотки	Калий бензилпенициллин или динитрофторбензол	Бензилпенициллол- или динитрофенил-коллаген (измельченная кожа)	701

Анти- β_2 -микроглобулин, иммуноглобулин	β_2 -Микроглобулин	Биогель А-50m	955
Антифениларсоновые антитела	Антиген	КМ-целлюлоза	1263
Антибелковые антитела	Белки [трансферрин, белок Бенс-Джонса (тип L), иммуноглобулины G и M]	Белки, полимеризованные хлоругольным эфиром	52
	Белки [иммуноглобулины, белок Бенс-Джонса (типы K и L), сывороточный альбумин, глюкозо-оксидаза, пероксидаза]	Белки, сшитые глутаральдегидом	53
Антипротромбин, иммуноглобулиновая фракция	Протромбин	Сефароза 4B	1243
Антисыворотка к α -фетопротенну	Эстрадиол-17 β -мономемисукцинат	Диаминоная-сефароза 4B	38
Антисыворотка к <i>Shigella sonnei</i>	Липополисахариды <i>Shigella sonnei</i>	BrCN-активированная сефароза 4B или эпоксиактивированная сефароза 6B	970
		BrCN-активированная сефароза 4B	829
Антиагглютинин соевых бобов γ -глобулин	Агглютинин соевых бобов	Сефароза 4B	490
Антитироглобулин аутоантитела	Человеческий тироглобулин	BrCN-активированная сефароза 4B	996
Антитоксические компоненты (типа A или B), иммуноглобулины	Токсические компоненты (типа A или B)		
Бактериальные специфические антитела	Высушенные ацетоном полимеризованные бактерии	Полимеризованные бактерии в смеси с целлюлозой	1256
Бычий антитела к лимфоцитам мыши	Тимоциты	Сефароза 2B	290
Углеводспецифичные иммуноглобулины	Олигосахариды	Сефароза 4B	585
	Гликопротеиновый фетuin	То же	1042
Глобулин (главный) из фасоли (<i>P. vulgaris</i>)	Белок G1 из <i>P. vulgaris</i>	» »	1123
¹²⁵ I-Меченый иммуноглобулин G	Стафилококковый белок A	Сефароза 4B или АН-сефароза 4B	845
Иммуноглобулины из человеческой сыворотки	Белок A из <i>Staphylococcus aureus</i>	Сефароза 4B	506
	Человеческий 7S γ -глобулин	То же	885
Иммуноглобулин A нормальной сыворотки и при миеломе	L-Фенилаланин	» »	284
Иммуноглобулин G, моноспецифический для цитохром с оксидазы	Цитохром с оксидаза	» »	467
Иммуноглобулин G3 из человеческой сыворотки	Белок A	» »	505

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Иммуноглобулин М	Конканавалин А	Конканавалин А, полимеризованный глутаральдегидом	288
— из лимфоцитов мыши	Штамм Cowan 1 из <i>Staphylococcus aureus</i>	Фиксированные формалином и убитые теплом бактерии	631
— Вальденстрема	n-Диазонийфенилфосфонилхоллин	BtCN-активированная сефароза 4В с глицилтиозином	950
¹³¹ I-Меченый кроличий антиальбумин быка	Сывороточный альбумин	Биогель Р-300	564
Стрептококковые грушовой специ- фичности полисахаридные анти- тела из кроличьей гипериммунной сыворотки	Частично деацелированный стрепто- кокковый полисахарид	BtCN-активированная сефароза 4В или сефароза 4В с лизином	958
<i>Антигены и гаптены</i>			
Альбумин (человека)	Антиальбуминовые антитела	Антитела, полимеризованные хлор- угольным эфиром	52
Антигены	Антитела	Биогель Р-300	1167
	Антитела (антиальбумин сыворотки человека, антииммуноглобулин G)	Антитела, полимеризованные хлор- угольным эфиром	52
	Антитела (антииммуноглобулины, ан- тиальбумин сывороточный)	Антитела, сшитые глутаральдегидом	53
Австралийский SH-антиген из мочи	Антисыворотка к австралийскому SH-антигену	Сефароза 4В	1193
Австралийский антиген в комплексе с фракциями IgG кролика	Анти-IgG кролика	Целлюлоза	542
Обращающийся антиген	Кроличий γ-глобулин	Купрофан	1165
Белки мембраны эритроцитов после избирательного модифицирования тринитробензолом	Антидинитрофенильные антитела	Сефароза 4В	1156
Флуоресцентный овалбумин	Антиовальбуминовые антитела	Аминоцеллюлоза	404
γ-Глобулин	Антитела	Антитела, дисульфидно связанные с тиолактоном N-ацетилглютамина	237

Глюкагоноподобная иммунореактивность	Антитела к панкреатическому глюкагону	Сефароза 4В	824
Глюкагон (свиной панкреатический) и глюкагоноподобная иммунореактивность (кишечник свиньи)	Антитела против глюкагона	То же	823
J-цепь полимерного иммуноглобулина	Антитела к легким цепям иммуноглобулина человека	Сефароза	804
β-Антиген гепатита	Конканавалин А	"	836
Поверхностный антиген гепатита В	Антитела к антигену	Сефароза 4В	541
Человеческий γ-глобулин	Антитела к человеческому γ-глобулину	Стекло	1257
Человеческие гистосовместимые антигены локусов HLA-A и HLA-B	Анти-β ₂ -микроглобулиновый иммуноглобулин	Биогель А-50п	955
Человеческий иммуноглобулин А и М	Антитела	Биогель Р-300	1004
Имуноглобулины поверхности лимфоцита	"	Сефароза 4В	484
Лизергид (диэтиламид D-лизергиновой кислоты)	Антитела к лизергиновой кислоте	Агароза с длинной цепью гидразидного производного	730
Имуноглобулины из сыворотки IgM-глобулины	Антитела к легкой цепи	Сефароза 4В	389
Имуноглобулин G подклассов аллоантисыворотки мыши	Анти IgM-глобулины человека	То же	73
Имуноглобулины Е (IgE)	Специфические антисыворотки против подклассов иммуноглобулина мыши	BгCN-активированная сефароза 4В	582
Имуноглобулин М из сыворотки крысы и кролика	Анти-IgE антитела	Сефароза 2В	99
α ₂ -Макроглобулин	Антитела к IgM человека	Биогель Р-300	1003
РНК вирусный типа С антиген млекопитающих (р30)	Анти-α ₂ -макроглобулин человека	Сефароза 4В	1
Природный 7S иммуноглобулин М (человеческая сыворотка)	Антитело	То же	876
Овальбумин	Анти-IgG антитела	" "	285
	Антиовальбуминовые антитела	Полистирол	629
		Тнолированные и сшитые антитела	1117
		Аминоцеллюлоза	404
		Дисульфидсшитые антитела с N-ацетилглюкозамин-6-фосфатом	237
		Полистирол	629
Защитный антиген против сибирской язвы	Антитело		

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Белок А из <i>Staphylococcus aureus</i>	Иммуноглобулины из человеческой сыворотки	Сефароза 4В	506
Кроличий иммуноглобулин G	Антитела	Биогель Р-300 с глутаральдегидом	1167
Секреторный иммуноглобулин А	Антитела к α -цепи свиного иммуноглобулина	ВгСN-активированная сефароза 2В	262
Тиоредоксин из <i>Escherichia coli</i> и фага T ₄	γ -Глобулиновые фракции кроличьего антипиоредоксина	Сефароза 4В	1079
Вителлогенин из плазмы петухов, получавших эстроген	Антилиповителлиновые антитела	Сефароза	263
Клетки и клеточные органеллы			
Жировые клетки	Инсулин	Сефароза 4В	1092
Антигенсвязывающие клетки из селезенки мыши	Антигены	Найлоновые волокна	984, 986
Антигенреактивные клетки из нормального кроличьего костного мозга	»	Дисульфидно связанные антитела с тиолактоном N-ацетилгомоистеина	237
Антигаптенные клетки, образующие бляшки	δ -N-2,4-Динитрофенил-L-орнитин-HCl	Стекланные шарики, покрытые антигеном	2
Антигаптенные специфические лимфоциты	Азофенил- β -лактозидные гаптеносные группы	Сефароза 2В	1197
Бактериофаг SKVI	Липополисахариды из <i>Shigella sonnei</i>	Биогель Р-6 с гистамином	958
Клетки (эритроциты, тимоциты) — селезенки	Конканавалин А	ВгСN-активированная сефароза 4В или эпоксиактивированная сефароза 6В	970
	Динитрофенилированный сывороточный альбумин	Найлоновое волокно	309
		Динитрофенилированный сывороточный альбумин или желатиновые волокна	309
— популяции специфических антителопродуцирующих и специфических клеток памяти	Человеческий или бычий сывороточный альбумин или овальбумин куры	Стекланные шарики или дегалан V26	958

— продуцирующие антигепатитовые антитела	Азофенил-β-гликозид	Биогель Р-6 с гидразином и гистамином	1196
Культура раковых клеток	Изопротеренол, кортикотропин (АКТГ), тринодитронин	Стекло или сефароза	1224
Эритроциты	Антиэритроцитарные антитела	Сетчатая полиэфирная полнуретановая пеня	341
Жировые клетки	Конканавалин А	Сефароза 6В	310
Желудочные	Инсулин	Сефароза 4В	1092
β-Галактозидазаспецифичные полисомы	Анти-Нб глобулины	То же	360
Иммунные клетки	п-Аминофенил-β-D-тиогалактопиранозид	Сефароза с 3-аминосукцинил-1,6-диаминогексаном	785
Иммуноглобулинпроизводящие лимфоциты	Апиген (сывороточный альбумин или овалбумин)	Стеклянные или пластмассовые шарики, покрытые молекулами антигенного белка	1276
Иммуноспецифичные клетки-предшественники из неиммунизированных мышей	Антииммуноглобулиновые антитела	Пластмассовые шарики, покрытые антииммуноглобулиновыми антителами	167
Лимфоциты антигепатит-специфичные	Азофенил-β-лактозид	Биогель Р-6 с гидразином и гистамином	497
— специфичные иммунокомпетентные Т	β-Лактозидные гаптены	Акриламид	1293
— Т и В из селезенки мыши	Фитомитогены	Сефароза 4В	444
	Антиидиотипические антитела	Шарики дегалана, покрытые антителами	117
	Антигены (конъюгаты гаптен — бычий сывороточный альбумин, гемопинин подковообразного краба или конканавалин А)	Найлоновые волокна	985
— Т и В из лимфоидного грудного протока крысы	Человеческий иммуноглобулин после обработки антисывороткой	Поверхностная тканевая культура на пластмассе	66
Везикулы из мембраны лимфоцитов	Анти-F(ab') ₂ крысы, антитела	Сефадекс G-200	238
Лимфоидные клетки	Конканавалин А	Очищенный колибактериофаг K29	1241
	Бычий сывороточный альбумин или его производные	Найлоновые волокна	310
— — из селезенки и тимуса крысы и селезенки мыши	Агрегированный иммуноглобулин крысы	Сефароза 4В	773
Мембраны	Конканавалин А	Очищенный колибактериофаг K29	1241

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Овальбуминсинтезирующие полисомы в комплексе с анти-альбуминовы- ми антителами	Овальбумин	Овальбумин, спитый глутаральдеги- дом	884
Плазматические мембраны из клеток лимфатических узлов свиньи	Конканавалин А	Колибактернофаг K29	1242
Полирибосомы из плазмоцитома мы- ши, продуцирующей IgG1 имму- ноглобулин типа χ и чистая мРНК	Комплекс мышинного иммуноглобули- на с кроличьими антителами	Аминоцеллюлоза	1067
Полисомы	Комплексы антиген — антитело Антитело к специфическому белку Пиридоксаминфосфат	» Агароза Сефароза 4В с этилендиамином и ян- тарным ангидридом	1068 349 1170
Пролиферативные клетки	Конканавалин А	Конканавалин А — сефароза	266
Рибосомы ретикулоцитов	Полиуридиловая кислота	Сефароза 4В	685
Рибосомы из <i>Escherichia coli</i>	Стрептомицин или гентамицин	Индубиоза 4А	691
Рибосомы, синтезирующие тирозин- аминотрансферазу из клеток культуры тканей гепатомы	Пиридоксамин-Р	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином и янтарным ангидри- дом	794
Тимоциты	Антитимоцитный глобулин	Сефароза 4В	337
T4 фаг	Поли-D, L-лизин	Сефароза 2В	1133
Транслирующие рибосомы	Полнуридиловая кислота, окисленная перидатом	КМ-целлюлоза с дигидразидом ди- тиогликолевой кислоты	97
Кофакторы и витамины			
Антигепариновый кофактор тромби- на III	Гепарин	Сефароза 4В	251
Биотин	Авидин	То же	130, 446
Кофермент А	Аффинный к коферменту А белок СоА-связывающий белок л-Ацетоксимеркурианилин	Сефароза 6В	776 203 775
Кофактор ферментов NAD из экстрак- та дрожжей	Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1)	BrCN-активированная сефароза 4В	255
Флавинадениндинуклеотид	л-Ацетоксимеркурианилин	Сефароза 6В	775

Рибофлавин-5'-фосфат и его аналоги	Апофлаводоксин	Сефароза 4В	779
Ферменты			
Ацетилхолинэстераза (ацетилхолин-гидролаза, КФ 3.1.1.7) из эритроцитов	Триметил-(<i>m</i> -аминофенил)аммоний-хлорид хлоргидрат	Биогель А-50т с 3,3'-диаминодипропиламином и янтарным ангидридом, дважды присоединенными	111
— из электрического угря	Триметил-(<i>p</i> -аминофенил)аммоний-хлорид хлоргидрат	То же	111
— из <i>Bungarus fasciatus</i>		Сефароза 4В	666
— из электрического угря и мембран эритроцитов		AF 201	259
		2%-ая агароза (биогель) с 3,3'-диаминопропиламином и янтарным ангидридом, дважды присоединенными	110, 111
— из бычьих эритроцитов	ϵ-Аминокапроилхолиновые производные <i>d</i> -Тубокурарин	Сефароза 2В	1037
	2-Аминоэтил- <i>p</i> -нитрофенилметил-фосфонат	Сефароза 4В с этилендиамном, янтарным ангидридом, этилендиамином и <i>p</i> -аминобензойными остатками	603
— из мозга морской свинки	<i>m</i> -Карбоксифенилтриметиламмоний-нодид [N-(ϵ -Аминокапроил)- <i>p</i> -аминофенил]триметиламмонийбромид бромгидрат	Сефароза 4В со связанными 1,5-диаминопентаном и янтарным ангидридом	41
		Сефароза 4В с 1,4-диаминобутаном	1302
		Сефароза 2В	608
		Сефароза 4В	975
		Сефароза 2В с дважды присоединенными гексаметилендиамином и янтарным ангидридом	536
		Сефароза 2В	294—296
		То же	294
	1-Метил-9-[N ^B -(ϵ -аминокапроил)- β -аминопропиламино]акридиний-бромид бромгидрат		

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из эритроцитов человека	2-Аминоэтил- <i>p</i> -нитрофенилметилфосфонат·HCl <i>m</i> -[6-(6-Аминокапрониламино)капро- ниламином]фенилтриметиламмо- нийбромид бромгидрат	Сефароза 4В с дважды присоединен- ными 1,5-диаминопентаном и ян- тарным ангидридом Сефароза 4В	1234 450
— из бычьих хвостатых ядер	<i>m</i> [6-(6-Аминокапрониламино)ка- прониламино]фенилтриметилам- монийбромид бромгидрат	То же	981
— из свежих пластинок электриче- ского органа <i>Electrophorus electri-</i> <i>cus</i>	<i>m</i> - и <i>p</i> -Изомеры N-(6-аминокапро- нил)-1-аминофенилтриметилам- монийбромид бромгидрат	Сефароза 2В, сшитая и восстановлен- ная	806
— из ткани головы домашней мухи	Конканавалин А (1) + <i>m</i> -триметилам- монийанилин (2)	Конканавалин А—сефароза (1) + аф- фигель 202 (2)	1110
Ацетил-СоА-апокарбоксилаза	Авидин	Сефароза 4В	678
N-Ацетил-β-глюкозаминидаза (2-ацетамид-2-дезоксид-β-D-глю- козид ацетамидодезоксиглюкогид- ролаза, КФ 3.2.1.30)	<i>p</i> -Аминофенил-N-ацетил-β-D-глю- козаминид	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином и янтарным ангидри- дом	606
	<i>p</i> -Аминобензил-1-тио-2-ацетамидо- 2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид	Сефароза 4В с гексаметилендиамином и янтарным ангидридом	930
	<i>p</i> -Аминофенил-N-ацетил-β-D-тиоглю- козамин	Сукцинированная диаминодипро- пиламиноагароза	445
	Гликопептид протеогликана	Сефароза 4В	260
— из мочи человека	Конканавалин А	То же	64
	2-Ацетамидо-N-(ε-аминокапронил)- 2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид- амин	» »	649
	<i>p</i> -Аминофенил-N-ацетил-β-D-тиоглю- козаминид	N-Оксисукцинимидный эфир сукцини- лированной аминоалкилагарозы	63
	2-Ацетамидо-2-дезоксид-D-манноно- 1,4-лактон	Сефароза 4В с бензидином	912

— из *Trichomonas foetus*

Кислые β -галактозидазы А и В
(КФ 3.2.1.23)

— из печени человека

Кислые гликозидазы (глюкоцеребро-
зид- β -глюкозидаза, β -N-ацетил-
глюкозаминидаза, β -галактозида-
за)

Кислая α -D-маннозидаза (КФ 3.2.1.24)
из печени человека

Аденозин-3',5'-фосфатзависимые фер-
менты

(Na⁺ + K⁺)-аденозинтрифосфатаза
(КФ 3.6.1.3)

Аденозинтрифосфатаза (митохонд-
риальная)

— из митохондрий сердца быка

Солюбилизированная детергентом
Na⁺, K⁺-АТРаза (КФ 3.6.1.3)

S-Аденозил-L-метионин-декарбокси-
лаза из печени крысы и яиц мор-
ского ежа

Аденилатциклаза [АТФ-пирофосфат-
лаза (циклизующая), КФ 4.6.1.1]

Агароза из *Littorina mandshurica*
Альгиназы
 α -Амилазы

N-(ϵ -Аминокапроил)-2-ацетида-
2-дезоксид- β -D-глюкопиранозил-
амин

Конканавалин А

1) Конканавалин А;
2) 6-аминогексил-1-тио- β -D-галакто-
пиранозид

Эффектор глюкоцереброзидазы

D-Маннозиламин

Нуклеотиды аденина

Диоксин

Ингибитор аденозинтрифосфатазы

Белковый ингибитор аденозинтрифос-
фатазы

6-(Пурин-5'-рибозилтрифосфат)-4-
(1,3-динитрофенил)тиозфир

л-Хлормеркурибензоат

л-Аминофенилмеркурн(II)ацетат

«Активная» субъединица токсина хо-
леры

Агароза

Альгиновые кислоты

Крахмал

BrCN-активированная сефароза 4В

Конканавалин А — сефароза

1) Конканавалин А — сефароза;
2) сефароза 4В

BrCN-активированная сефароза 4В

CN-сефароза 4В

Сефароза 4В

Сефароза 4В с этилендиамином или
3,3'-диаминодипропиламином или
декаметилендиамином
Сефароза 4В

BrCN-активированная сефароза 4В

Сефароза 4В, предварительно обра-
ботанная эпихлоргидрином и бо-
рогидридом натрия с 3,3'-имино-
биспропиламином и тиолактоном
N-ацетилгомоцистеина

BrCN-активированная сефароза с
этилендиамином

Сефароза 4В

Сефароза 2В

Биогель А-5м

Биогель Р-20 с гидразингидратом

Крахмал

315

849

792

508

903

456

860

1140

1141

29

754, 755

244

98

1214

350

530, 1109

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из <i>Clostridium acetobutylicum</i>			516
— из проростков ячменя			1036
	Гликоген	Гранулы крахмала	292
— из тритикали	Циклогептаамилоза	АН-сефароза 4В	1176
Амилазы из личинки <i>Tenebrio molitor</i>	Белковые ингибиторы из зерен пшеницы	Эпоксифункционизированная сефароза 6В	1071
и куриной поджелудочной железы	Циклогексаамилоза	Сефароза 2В	158
β -Амилаза (из батата)			
Апоглутаматоксалоацетаттранс-аминаза (КФ 2.6.1.1)	N'-(ω -Аминогексил)пиридоксамин-5'-фосфат	Сефароза 6В с 1,4-бис-(2,3-эпокси-проокси)бутаном	1235,
Апотриптофаназа	Пиридоксаль-5'-фосфат (3-О-иммобилизованный)-триптофанкомплекс	Сефароза 4В	1236
			223
Апотирозинфеноллаза	Пиридоксаль-5'-фосфат (3-О-иммобилизованный)	Сефароза с гексаметилендиамином и О-бромацетил-N-оксисукцинимидом	558
Аргиназа (L-аргининамидиногидролаза, КФ 3.5.3.1) из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-Аргинин	То же	558
— из полуочищенного экстракта печени крысы	Антиаргиназные антитела	Сефароза 6В с гексаметилендиамином и янтарным ангидридом	897
Арилсульфатаза А (КФ 3.1.6.1)	Психонинсульфат	Сефароза 4В	1157;
Арилсульфатазы	2-Нитрохинолсульфат	То же	1158
			142
L-Аспарагиназы (КФ 3.5.1.1)	Антитела к L-аспарагиназе	n-Аминобензамидэтильное производное сефарозы 4В	7
— из <i>Proteus vulgaris</i>	N-(ω -Аминогексил)-L-аспарагин-овая кислота	Стекло	1257
Аспарагиназа и аспарагиназа, модифицированная тетранитрометаном	То же	Сефароза 6В	204
	D-Аспарагин	То же	1183
— из <i>Escherichia coli</i>	D-Аспарагин с гексаметилендиамином	Аминоэтилполиакриламидные магнитные частицы с 1,4-бутандиолдиглицидным эфиром	302
		Сефароза 6В	656

— из <i>Escherichia coli</i> и <i>Erwinia carotovora</i> Аспартаза (КФ 4.3.1.1)	Na-(6-Аминогексил)-D-аспарагин	То же	674
— из <i>Escherichia coli</i> Аспартат-β-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.12)	N-(ω-Аминогексил)-L-аспарагиновая кислота	» »	1183
Аспартаттранскарбамилаза (КФ 2.1.3.2)	То же	» »	204
	» »	» »	204, 1183
	1,10-Диаминодекан и янтарный ангидрид или пиромеллитиновый диангидрид	» »	1311
Бактериолитические ферменты из очищенных препаратов животного и микробного происхождения	N-(3-карбоксипропионил)аминодекан	Сефароза 4В	1312
Бактериофаг 12 репликаза	Лизоцимный лизат клеточных стенок <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	BгCN-активированная сефароза 4В	1315
Биосинтетическая треониндеаминаза [L-треонингидролаза (деаминирующая), КФ 4.2.1.16]	Однонитевая 12 РНК	Целлюлоза	351
Карбоангидраза (КФ 4.2.1.1)	Валин и изолейцин-N-гексаметилендиамин	Сефароза 4В	639
	Сульфаниламид	Сефадекс G-150	345
	Сульфамилон (n-аминометилбензол-сульфонамид)	Сефароза 4В	1269, 1270
	2-Амино-1,3,4-тиадиазол-5-сульфонамид	Сефароза с NH ₂ (CH ₂) ₁₀ COOH	183
— изоэнзимы	n-[2,4-Диаминофенил]азо]бензол-сульфонамид (пронтозил)	КМ-сефадекс	878
Катаболическая дегидрохиназа (5-дегидрохинатгидролизаза, КФ 4.2.1.10) из <i>Neurospora crassa</i>	Антидегидрохиназный иммуноглобулин	Сефароза 4В	485
Холинэстераза	m-Аминофенилтриметиламмоний	СН-сефароза 4В	904
Хоризматугаза из <i>Claviceps paspali</i>	L-Триптофан	Сефароза 4В	1106
Цитохром P-450	1,8-Диаминооктан	То же	560
— из митохондрий коры надпочечников быка	Анилин	» »	1151
NAD-зависимая глицерин-3-фосфат-дегидрогеназа цитозоля (КФ 1.1.1.8)	n-Октиламин		1248
	2,4,6-Тринитробензол	Сефароза 4В с гексаметилендиамином	647

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Дезаминазы			
Аденозиндезаминаза (аденозинаминогидролаза, КФ 3.5.4.4)	Иммобилизованный по 6-положению аденозиновый аналог	Сефароза 4В с гексаметилендиамном	75
— из селезенки теленка и слизистой кишечника, двенадцатиперстной кишки кур и эритроцитов	6-Амино-9-(β -аминобензил)аденин	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом	978
— из эритроцитов человека	Аденозин	Эпоксинактивированная сефароза 6В	1030
АМР-дезаминаза (КФ 3.5.4.6) из скелетных мышц человека	N ⁶ -(6-Аминогексил)5'-АМР	5'-АМР-сефароза 4В	753
Биосинтетическая треониндезаминаза (L-треонингидролаза дезаминирующая, КФ 4.2.1.16)	Изолейцин	Сефароза 4В	931
Гуаниндезаминаза (печени крысы)	L-Валин	То же	951
Дегидрогеназы	9-(β -Аминоэтоксифенил)гуанин	> >	60
Алкогольдегидрогеназа (алкоголь:NAD ⁺ -оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1)	NAD	Стекло	1259
— из мозга	NADP	Сефароза	1146
— дрожжевая	NAD ⁺ -N ⁶ -[N-(6-аминогексил)ацетамид]	Сефароза 4В	715
Алкогольдегидрогеназа	N ⁶ -(6-Аминогексил)-5'-АМР	Сефароза	859
— из неочищенных экстрактов семян хлопка	То же	Сефароза 4В	224
— изозимы печени лошади	Цибакрон голубой	Голубая сефароза 6В	677
— стероидактивируемый изозим печени лошади	N ⁶ -(6-Аминогексил)-АМР	Сефароза 4В	27
Апо- β -оксibuтиратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.30)	NAD	То же	28
Аспартокиназа I — гомосериндегидрогеназа из <i>Escherichia coli</i>	Антитела к ферменту	Сефароза 4В с ϵ -аминокапроновой кислотой	452
		Сефароза 4В	233

— и II и аспартокиназа III из <i>Escherichia coli</i>			1195
Дегидрогеназы из экстракта дрожжей	NADP ⁺	Сефароза 4В с ε-аминокапроновой кислотой	737
— из неочищенного экстракта дрожжей	N ⁶ -(6-Аминогексил)-5'-AMP	Сефароза 4В	236
— из неочищенных экстрактов	8-(6-Аминогексил)амино-AMP или 8-(6-аминогексил)амино-NAD ⁺	То же	687
— (алкоголь, глюкозо-6-фосфат, глицеральдегид-3-фосфат, изоцитрат, лактат и малат)	N ⁶ -(6-Аминогексил)-5'-AMP или N ⁶ -(6-аминогексил)-NAD ⁺	Сефароза	478
— с примесями цитохром с оксидазы	NAD	AG-NAD, тип 1	524
— и киназы	N ⁶ -(6-Аминогексил)-NAD ⁺	BrCN-активированная сефароза 4В	235
17β-Экстрадиолдегидрогеназа (КФ 1.1.1.62) из плаценты человека	Экстроингемисукцинат	Сефароза 4В с этилендиамином	843
17β-Экстрадиолдегидрогеназа	Эстриол-16-гемисукцинат	Сефароза 4В с 1,5-диаминопентаном	206
— из плаценты человека	n-Оксимеркурибензоат	Сефароза с этилендиамином	841
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (D-глюкозо-6-фосфат : NAD-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.49)	Эстрон	Сефароза 4В с амиокапроном	842
	NADP	Целлюлоза	261
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа		Сефароза 4В с ε-аминокапроновой кислотой	264
— из эритроцитов человека		Сефароза 4В с дигидразидом адипиновой кислоты	674
		Сефароза 4В с гидразидом адипиновой или себацтиновой кислоты	1284
		Агароза-NADP	1314
		Сефароза 4В	161
		Сефароза	611
		Сефароза 4В	738
— и глутаматдегидрогеназа, глутатионредуктаза и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа из неочищенного экстракта <i>Candida</i>	NADP ⁺ -N ⁶ -[N-(6-аминогексил)ацетамид]	То же	148
	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-2',5'-бисфосфат		

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из дрожжей и эритроцитов человека	8-(Аминогексил)амино-TPN ⁺	Сефароза 4В	686
Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.3)	GTP	Сефароза 4В со связанным γ -метило- вым эфиром L-глутаминовой кис- лоты	432
Глицеральдегид-3-фосфатдегидро- геназа (КФ 1.2.1.12)	NAD ⁺	Сефароза 4В с 6-аминогексановой кислотой	76, 810, 811
		Бензамидогексильное производное се- фарозы 4В	517
	ϵ -Аминокапронил-NAD ⁺	Сефароза	224
	То же	Сефароза 4В	807
Глицерин-3-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.8)	N ⁶ -(ϵ -Аминокапронил)-AMP 1-Гексаметилендиаминовый DL-глицерин-3-фосфата 6-Фосфоглюконовая кислота ϵ -Аминокапронил-NAD ⁺	То же BrCN-активированная агароза	809; 810 532
D-3-Оксибутиратдегидрогеназа из исочищенного экстракта <i>Rho-</i> <i>dopseudomonas spheroides</i>	аналог	Сефароза 4В с 1,6-гександиамином Сефароза 4В	781 807
15-Оксипростогландиндегидрогена- за (15-оксипростаиноатоксидо- редуктаза, КФ 1.1.1.141) из легких собак	NAD ⁺	CN-сефароза 4В	509
3 α -Оксистероиддегидрогеназа (3 α -оксистероид: NAD ⁺ -окси- доредуктаза, КФ 1.1.1.50) из <i>Pseudomonas testosteroni</i>	Гликохолевая кислота	BrCN-активированная сефароза 4В с этилендиамином	48
7 α -Оксистероиддегидрогеназа (КФ 1.1.1.159) из <i>Escherichia</i> <i>coli</i>	Хенодезоксикхолат	Сефароза 4В с этилендиамином	743
17 β -Оксистероиддегидрогеназа из <i>Pseudomonas testosteroni</i>	19-Нортестестерон-17-О-гемисукии- нат	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином	100

20 β -Оксистероиддегидрогеназа (КФ 1.1.1.53)	11 α -Оксипрогестерон-11-гемисукци- нил-бис- β -аминоэтилдисульфид- моноамид	Агароза	1142
Инозин-5'-монофосфатдегидрогена- за (IMP:NAD-оксидоредукта- за, КФ 1.2.1.14)	Гуанозин-5'-монофосфат	Сефароза 4В с гексаметилендиамином и янтарным ангидридом	652
Изоцитратдегидрогеназа	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-5'-мо- нофосфат или N ⁶ -(6-аминогек- сил)аденозин-2',5'-бисфосфат	Сефароза 4В	148
L-Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) из сердца быка	N ⁶ -(6-Аминогексил)-АМР	Сефароза	859
— из мышцы акулы			611
— из сыворотки крови человека		Сефароза 4В	611
	8-(6-Аминогексил)амино-АМР	То же	811
— (человека)	P ¹ -(6-Аминогексил-1)-P ² -(5-адено- зил)пирофосфат	» »	1191
	6-Иммобилизованный аналог АМР		58
	NAD ⁺		1191
	NAD ⁺	Сефароза 4В с гексаметилендиами- ном	75
	ϵ -Капронил-NAD ⁺	Сефароза 4В с 6-аминокапроновой кислотой	735, 736, 811
	Оксалат калия	Сефароза 4В с гексаметилендиамином и диазотированным л-аминобен- зильным производным	76
— X из тестикул мыши	То же	Сефароза 4В	807
	Оксамат	Сефароза 4В с гексаметилендиами- ном	1103
L-Лактатдегидрогеназа из печени крысы и гепатомы	Голубой декстран	Сефароза с гексаметилендиамином	1102
— из <i>Lactobacillus casei</i>	Цибакрон голубой F3G-A	Аминогексил-сефароза 4В	342
— изоферменты	Аденозин-5'-монофосфат	Сефароза	1194
	N ⁶ -(6-Аминогексил)-АМР	Сефароза 4В	988
— — из тканей крысы	Оксалат калия	Сефадекс G-200	435
	Оксамат	N ⁶ -(6-Аминогексил)-сефароза	149
		Сефароза 4В	808
		Сефароза 4В с гексаметилендиамином	854, 855
		То же	287

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Липоамиддегидрогеназа (NADH: липоамидоксидоредуктаза, КФ 1.6.4.3) из сердца свиньи, дрожжей и <i>Escherichia coli</i>	Пропиллипонамид	Стекло	1039
— изоферменты из сердца свиньи	Липонилхлорид NAD ⁺ и липоат	Аминоалкилстекло Сефароза 4В с ϵ -аминокапроновой кислотой и сефароза 4В с этилендиамином или L-лизинном	1038 1229
Малатдегидрогеназа	NAD ⁺	Сефароза 4В с гексаметилендиамином и диазотированное <i>p</i> -аминобензильное производное	76
NADP ⁺ -специфичная изоцитратдегидрогеназа [<i>трео</i> -D-изоцитрат: NADP ⁺ -оксидоредуктаза (декарбоксилирующая), КФ 1.1.1.42] из <i>Escherichia coli</i>	NADP ⁺	Агароза—гексан—NADP (Sigma)	553
— — — из <i>Bombyx mori</i>	NADP (окисленный периодатом)	Сефароза 4В с дигидразидом адипиновой кислоты	791
NAD-зависимая α -глицерофосфатдегидрогеназа	Незамещенная агароза	Биогель А-0,5м	57
NAD- или NADP-связанные дегидрогеназы	NAD или NADP	Целлюлоза	734
Никотинамиднуклеотидзависимые дегидрогеназы	Аденозинфосфат	Сефароза 4В	1189
Фосфоглюконатдегидрогеназа	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-5'-монофосфат или N ⁶ -(6-аминогексил)аденозин-2',5'-дифосфат	То же	148
Белки со вторичной надструктурой, обусловленной укладкой динуклеотида (алкогольдегидрогеназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, лактатдегидро-	Голубой декстран	BrCN-активированная сефароза 4В	1172

геназа M_4 или H_4 , малатдегидрогеназа, аденилаткиназа, фосфоглицераткиназа, фосфоглицеромутаза, рибонуклеаза, ферроцитохром с)			
Пиридиннуклеотидтрансгидрогеназа из <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2'-АМР	Сефароза 4В	1269
Сукцинатдегидрогеназа (сукцинат:(акцептор) оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1) из <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Оксалоацетат	Сефароза 4В с дихлоргидратом кадверина	719
Тетрагидрофолатдегидрогеназа (5,6,7,8-тетрагидрофолат: $NADP^+$ -оксидоредуктаза, КФ 1.5.1.3)	Метотрексат	Агароза с этилендиамином	411
— из L_{1210} лейкемии			
L-Треониндегидрогеназа	Птерониллизин NAD^+	Сефароза с этилендиамином	194
Дегидрогеназа уридиндифосфат-глюкозы	P^1 -(6-Аминогексил-1)- P^2 -(5'-уридил) пирофосфат	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном	620
Ксантиндегидрогеназа (КФ 1.2.1.37) из такого типа <i>Drosophila melanogaster</i>	Антитела к ферменту	Сефароза 4В с этаноламином	894
Дезоксирибонуклеаза (дезоксирибонуклеат олигонуклеотидгидролаза, КФ 3.1.4.5) из бычьей поджелудочной железы	Однонитевая (денатурированная теплом) ДНК тимуса теленка	Сефароза 4В с ϵ -аминокапроновой кислотой	737
— из селезенки свиньи	То же	Сефароза 4В	1189
— (ДНКазы) II из селезенки свиньи и быка	Антитела к ДНКазе II селезенки свиньи	BrCN-активированная сефароза	30
— из тестикул и выносящих протоков краба <i>Cancer pagurus</i> (нейтральная)	Ядерная РНК	Сефароза 4В	1009
— для удаления протеаз	Ингибитор протеазы из бобов лнмы	То же	1009
— АТР-зависимая	ДНК	Сефароза 2В	989
		Сефароза с ϵ -аминокапроновой кислотой	990
		Сефароза 6В	879
		Агароза	448

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
DT-диафороза (КФ 1.6.99.2) из печени крысы	Дикумарин	Сефароза 4В с бисаминпропиламином и янтарным ангидридом	935
Допамин β-гидроксилаза (3,4-диоксифенилэтиламин, аскорбат:кислородоксидоредуктаза, КФ 1.14.17.1)	Тирамин	<i>п</i> -Аминобензамидоэтил-сефароза 4В	49
Эндо-β-(1→4)ацетилглюкозаминидаза из <i>Staphylococcus aureus</i>	Хитин	Хитин	697
Эндополигалактуроназа (поли-α-1,4-D-галактуронидгликангидролаза, КФ 3.2.1.15) из <i>Aspergillus niger</i>	Пектовая кислота	Пектовая кислота, сшитая эпихлоргидрином	945
Энтерокиназа из секрета двенадцатиперстной кишки человека	<i>п</i> -Аминобензамидин	Сефароза 4В с глицилглицином	443
Ферменты, действующие на миоинозитол	D,L-4-[N-(Этиламино)аминометил]эпипинозитол	Сефароза 4В со связанной <i>ε</i> -аминокапроновой кислотой	640
Ферменты метаболизма миоинозитолфосфатов	Миоинозитол-2-фосфат	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном	1015
С1-эстераза из нормальной сыворотки крови человека	Комплекс яичного альбумина с анти-телом	Сефароза 4В	1129
Экзоамилаза из <i>Pseudomonas stutzeri</i> (1,4-α-D-глюканмальтотетрагидролаза, КФ 3.8.1.60)	Декстраны	Сефадекс G-100	267
Флавиномононуклеотидзависимые ферменты (NADPH-цитохром с редуктаза, пиридоксинфосфатоксидаза, гликолатоксидаза)	Рибофлавинфосфат	Целлюлоза, фосфоцеллюлоза или ДЭАЭ-целлюлоза	40
Флавокиназа	Флавин	КМ-целлюлоза	39
Форминиотетрагидрофолатцикло-дезаминназа (КФ 4.3.1.4)	Тетрагидрофолат	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном	1081
α-L-Фукозидназа	Фукозамин	Агароза-ε-аминокапроилфукозамин	16

β -1,4-Галактаназа из <i>Bacillus subtilis</i>	Тетрасахарид из гидролизата галактаназой β -1,4-галактана с β -(<i>n</i> -аминофенил)этиламино (восстановленным до вторичного амина)	Бромцетамидогексил-сефароза	670
α -Галактозидаза (церамидтригексозидаса) из фракции IV—I по Кону	Мелибиоза	Сефароза с янтарным ангидридом	757
α -Галактозидаза (α -D-галактозидгалактогидролаза, КФ 3.2.1.22)	<i>n</i> -Аминофенилмелибиоза N- ϵ -Аминокапроил-N- ϵ -аминокапроил- α -D-галактопиранозиламин N- ϵ -Аминокапроил- α -D-галактопиранозиламин или N- ϵ -аминокапроил-N- ϵ -аминокапроил- α -D-галактопиранозиламин D-Галактоно- α -лактон	Аффиноза 202 Сефароза 4В	758 476
α - и β -Галактозидазы		То же	475
β -Галактозидаза (β -D-галактозидгалактогидролаза, КФ 3.2.1.23) из <i>Aerobacter cloacae</i>	Антитела к ферменту	Сефароза 4В со связанным бензидином	610
— из <i>Escherichia coli</i>		Сефароза 4В	333
— из <i>Aspergillus niger</i>	<i>n</i> -Аминофенил- β -D-тиогалактопиранозид	Сефароза 4В с 3-аминосукцинил-3-аминодипропиламино	1112
		Стекло	1297
		Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламино и янтарным ангидридом	1111
		Магнитная окись железа с 3-аминопропилтриэтоксисилом и себадиновой кислотой	302
— из <i>Escherichia coli</i>		Сефароза 4В, сшитая дивинилсульфоном, с 3,3'-диаминодипропиламино, янтарным ангидридом, этилендиамином и янтарным ангидридом	966
— из <i>Aspergillus niger</i>		Алкиламино-CPG с малоновой или азеланиновой кислотой	82
— дикий тип и некоторые мутантные белки	Антитела к ферменту	Сефароза 4В	786

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Глюкоамилаза (кишечная кролика) β -D-Глюкозидаза	Декстраи δ -D-Глюконолактон	Сефадекс G-200 Сефароза 4В со связанным бензиди- ном	1078 609
Глюкозилсфингозин- β -D-глюкозида- за			609
β -Глюкуронидаза (печени крысы) (КФ 3.2.1.31)	<i>п</i> -Аминофенил-N-ацетил- β -D-глюкоз- аминид	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином и янтарным ангидри- дом	606
	Сахаро-1,4-лактон	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином	477
γ -Глутамилгидролаза	Гекса- и гентаглутаматы	АН-сефароза 4В	1070
Гликозидазы из такедиастазы или соевых бобов	Ди- ϵ -аминокапроил- <i>п</i> -аминофенил- N-ацетил-1-тио- β -D-глюкозамин- ид, β -D-глюкозид, β -D-галакто- зид или α -D-маниозид	BrCN-активированная сефароза 4В	784
Гуанилатциклаза (GTP-пирофосфат- лиаза, КФ 4.6.1.2)	Окисленный периодатом GTP	BrCN-активированная сефароза с ди- гидразидом адипиновой кислоты	409
Гексозаминидазы А и В (человека) (β -2-ацетида-2-дезоксид- β -D-глю- козидацетидаиддезоксиглюкогидро- лаза КФ 3.2.1.30)	2-Ацетамид-N-(ϵ -аминокапроил)- 2-дезоксид- β -D-глюкопиразид- амин	Сефароза 4В	412
β -Гексозаминидаза	Бычий γ -глобулин к α -участку	BrCN-активированная сефароза 4В	1230
Гексозаминидазы (β -галактозидаза, β -N-ацетилглюкозаминидаза и α -маннозидаза)	<i>п</i> -Амилосеизил-1-тио-2-ацетамид-2- дезоксид- β -D-глюкопиранозид	Сефароза 4В с гексаметилендиами- ном, обработанная янтарным ан- гидридом	930
Гистаминназа (диаминоксидаза, КФ 1.4.3.6) из плазмы беремен- ных женщин	Кадаверин (диаминопентан)	Сефароза 4В	86
Гистидиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.22) из мастоцитомы мышей	<i>п</i> -Октилглицидный эфир	То же	470
Гистонфосфатаза из полиморфоядер- ных лейкоцитов человека	Гистон	> >	1203

Гиалуронидаза (гиалуронатгликан- гидролаза, КФ 3.2.1.35) из семен- ной жидкости быка — (тестикулярная)	Конканавалин А	» »	1304
α -Изопропилмалатизомераз (дрож- жевая) (КФ 4.2.1.33)	Лейцин или валин	Сефароза 6В	61
Δ^5 -Кетостеронидизомераз из <i>Pseudo-</i> <i>monas testosteroni</i>	19-Нортестостерон-17-О-гемисукци- нат	Сефароза 4В	111
Киназы		Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином	100
Аденозин-3,5'-монофосфатзависи- мая протенинкиназа (жировая ткань)	Гистон или казеин	Сефароза 2В	227
Киназы L-арабинозы из <i>Phaseolus</i> <i>auratus</i>	8- β -Аминоэтилгидроаденозинтрифос- фат	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином и ятарным ангидри- дом и N-оксисукцинимид-сефаро- за	184
Креатинкиназа (АТР: креатинфос- фоттрансфераза, КФ 2.7.3.2)	n-Меркурибензоат	Сефароза с этилендиамином	746
Креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2)	n-Хлормеркурибензоат	Аминоэтил-сефароза	132
Цикло-3',5'-АМР-зависимая проте- инкиназа (КФ 2.7.1.37) из ске- летных мышц кролика)	Казеин	Сефароза 4В	942
Цикло-GMP-зависимая протенинки- наза из легкого телят	N ⁶ -(2-Аминоэтил)аденозин-3'5'-мо- нофосфат	То же	279
Этаноламинкиназа и холинкиназа (КФ 2.7.1.32) из печени крысы	Голубой декстран	» »	638
Глюкокиназа (печени крысы) (КФ 2.7.1.2)	Холин	Эпоксифункционированная сефароза 6В	153
— из неочищенного супернатанта гомогената печени крысы	Глюкозамин с ϵ -аминокапроновой кислотой	BzCN-активированная сефароза 4В	202
	N-(ϵ -Аминокапроил)-2-амино-2- дезоксид-Д-глюкопираноза	Агароза	534
	То же	Сефароза 4В	67
	8-(6-Аминогексил)амино-ADP	То же	1191
	АТР	» »	56
	N-(6-Аминокапроил)-2-амино-2- дезоксид-Д-глюкоза	» »	533

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или ими обилизованные аффинные лиганды	Литература
Глицерокиназа (КФ 2.7.1.30)	АТР	Сефароза 4В с 6-аминокапроновой кислотой	736
Киназы (пируват, креатин, глицеро-, гексо- и 3-фосфоглицерат)	N ⁶ -(6-Аминогексил)-5'-АМР или N ⁶ -(6-аминогексил)-NAD ⁺	Сефароза	478
Фосфофруктокиназа (КФ 2.7.1.11) (дрожжевая)	Голубой декстран	Полнакриламидный гель (сшитый)	645
— из пивных дрожжей	Цибакрон голубой F3G-A	Сефадекс G-200	134
— из термофильных микроорганизмов	N ⁶ -(6-Аминогексил)-АМР	Сефароза 4В	1153
— (млекопитающих)	N ⁶ [(6-Аминогексил)карбамоклметил]-АТР	То же	496, 224
Киназы фосфорилазы (КФ 2.7.1.38)	Фосфорилаза b	BгCN-активированная сефароза 4В	933
T ₄ полинуклеотидкиназа из <i>Escherichia coli</i>	Одионитевая ДНК	BгCN-активированная сефароза с 1-амино-6-(бромацетамидо)гексаном	588
Протаминокиназа	8-(6-Аминогексил)амино-цикло-АМР	4%-ная агароза (для электрофореза)	1011
Пиридоксалькиназа (АТР: пиридоксаль-5'-фосфотрансфераза) (КФ 2.1.1.35)		Сефароза 4В	590, 591
Пируваткиназа (АТР: пируватфосфотрансфераза, КФ 2.1.1.40)	Цибакрон голубой	Бюгель А-1,5m	833
Сукцинаттноткиназа из сердца свиньи (CoA-зависимый фермент)	N ⁶ -(6-Аминогексил)-3',5'-ADP	Сефадекс G-200	972
Тиаминпирофосфокиназа (КФ 2.1.6.2)		Эпоксактивированная сефароза 6В	74
Тимидинкиназа (АТР: тимидин-5'-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.75) из <i>Escherichia coli</i>	Тиаминмонофосфат	Сефароза 6В с этилендиамином	1293
— из аденокарциномы кишечника крысы	5'-Амино-5'-дезокситимидин	Сефароза 4В	969
	Тимидин-3'-(4-аминофенилфосфат)	СН-сефароза 4В	651

β-Лактамаза (пенициллинаминолактамгидролаза, КФ 3.5.2.6)	Ампициллин	Индубиоза АСА-3/4	692
— из <i>Bacillus cereus</i>	Цефалоспорины с Метициллином	Индубиоза А4	690
Липазы		Сефароза 4В с флороглюцинолом, дивинилсульфоном и этилендиаминном	226
Липаза из <i>Pseudomonas nuphitica</i> (вариант <i>lyophilica</i>)	Гидрофобные лиганды	BrCN-активированная сефароза 4В	650
Липопротеинлипаза (КФ 3.1.1.34, гидролаза глицериновых эфиров)	Гепарин	Сефароза 4В	316, 338, 339, 408, 572, 862
Фосфолипаза С (фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза, КФ 3.1.4.3) из <i>Clostridium perfringens</i>	Липопротени яичного желтка	То же	1149, 724
Триглицеридлипаза	Гепарин	Сефароза	408
Липоксигеназа (линолеат: O ₂ -оксидоредуктаза, КФ 1.13.11.12)	Линолевая кислота	Аминоэтилагароза	451
Лизоцим (КФ 3.2.1.17)	Хитин	Хитин	200, 927
— Т4			589
— из белка куриных яиц и репы	Карбоксиметилхитин	Целлюлоза, покрытая хитином	562
	Дезаминированный хитин	Карбоксиметилхитин	561
	Лизоцимовый лизат бактериальных клеточных стенок	Глюкохитин	201
	n-Аминофенил-N-ацетил-β-D-глюкозаминид	BrCN-активированная сефароза 4В	1316
Лизоцимоподобные ферменты	Хитин	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом	604
Люцифераза (бактериальная)	Флавимононуклеотид	Целлюлоза, покрытая хитином	563
Маленлацетон-цис-транс-изомераза из <i>Vibrio</i> 01	Глутатион	Сефароза 6В с ε-аминокапроновой кислотой	1251
α-Маниозидаза (КФ 3.2.1.24)	n-Аминобензил-1-тио-2-ацетиамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид	Сефароза с N-(аминогексил)малеатом	805
	Маннозиламин	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном и янтарным ангидридом	930
		CN-сефароза 4В	964

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
NADP-зависимые «малик» ферменты	N ⁶ -(6-Аминогексил) аденозин-2',5'-дифосфат	Сефароза 4В	1306
Нейраминидазы			
Нейраминидаза, (спалидаза, N-ацетилнейраминатглицогидролаза, КФ 3.2.1.18) из <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Clostridium perfringens</i> и вируса гриппа	N-(4-Аминофенил)оксаминовая кислота	Сефароза 4В с глицилглицилтирозеном	242, 243
— из <i>Clostridium perfringens</i>	2-Аминоэтиламид-2-оксиэтил- α -кетозид N-ацетилнейраминовой кислоты или 2-аминоэтиламинокарбонилметил- α -кетозид N-ацетилнейраминовой кислоты	То же Сефароза 4В	269, 271 531
— из <i>Vibrio cholerae</i>	Кислый α_1 -гликопротеин, содержащий гликозидно связанную сиаловую кислоту	То же	413
— из <i>Clostridium perfringens</i>	N ⁶ -(6-Аминогексил) аденозин-2',5'-дифосфат	» »	522
Никотинамиднуклеотидтрансгидрогеназа (КФ 1.6.1.1) из <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Нуклеазы			
Эндоуклеаза из клеток млекопитающих	ДНК	Целлюлоза	169
Экзонуклеаза III из <i>Escherichia coli</i>	Однонитевая ДНК	4%-ная агароза (для электрофореза)	1011
— I из <i>Escherichia coli</i>	Денатурированная ДНК	Целлюлоза	937
— из <i>Staphylococcus aureus</i>	3'-(4-Аминофенилфосфорил)тимин-дин-5'-фосфат	BrCN-активированная сефароза	1283
— из <i>S. marcescens</i>	Нуклеиновые кислоты	Сефадекс G-75 с симм-триазинхлоридом, гексаметилендиамином и снова симм-триазинхлоридом	668
— (табачная внеклеточная)	NADP, окисленный периодатом	Сефароза 4В с дигидразидом адипиновой кислоты	583

— S₁ из такадиастазы
Стафилококковая нуклеаза

— — обработанная в различных условиях введения аффинной метки

Старый желтый фермент (NADPH-оксидоредуктаза, КФ 1.6.99.1)

Оксидазы
Альдегидоксидаза (КФ 1.2.3.1)

— из дикого типа *Drosophila melanogaster*

Аминоксидаза (моноамин: O₂-оксидоредуктаза (дезаминирующая, КФ 1.4.3.4) из аорты быка

— из *Aspergillus niger*

Цитохромоксидаза

Галактозооксидаза (D-галактоза: кислород-6-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.9)

Глюкозооксидаза

— из *Penicillium vitale*

Гликолатоксидаза

Фенолоксидаза из личинки домашней мухи

Пиридоксин-5'-фосфатоксидаза

Пируватоксидаза (пируват: цитохром b₁ оксидоредуктаза, КФ 1.2.2.2) из *Escherichia coli*

Ксантинооксидаза

— (молока)

Однонитевая ДНК
3'-(4-Аминофенилфосфорил) дез-окситимидин-5'-фосфат

Тимидин-3'-(п-аминофенилфосфат)-5'-фосфат

4-Ацетоксибензойная кислота

N-Бензил-6-метилникотинамид

Антитела к ферменту

Конканавалин А

Гексаметилендиамин
Цитохром с
Агароза

Конканавалин А

Специфические антитела
Флавинмононуклеотид
 $\text{NH}_2 \text{ (CH}_2\text{)}_2 \text{—NH—CO—CH}_2\text{—NH}$

HOOC—N, C_6

Флавинмононуклеотид
Этанолламин и тиаминпирофосфаты

9-(п-Аминозтоксифенил)гуанин
3-[1-Н-Пиразоло(3,4-д)пиримидин-4-иламино]-1-пропил-6-амино-капроат

Сшитый сополимер акриламида
Сефароза 4В

То же

Биогель А-5м с гексаметилендиамин-ом

Сефароза 4В с некоторыми диамино-алканами
BrCN-активированная сефароза

Сефароза 4В

BrCN-активированная сефароза 4В
То же
Сефароза 6В

Полимер конканавалина А, получен-ный с помощью глутаральдегида
Сефароза 4В
Целлюлоза
Сефароза 4В

ДЭАЭ-целлюлоза
Сефароза 4В с гексаметилендиамин-ом и янтарным ангидридом

Сефароза 4В
Сефароза 6В

1083
248
249

299, 300

4

210

30

1057

1182
880
482

51

1218
623
1063

623
852

60
314

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из печени крысы или коровьего молока	9-(<i>n</i> - β -Аминоэтоксифенил)гуанин	Сефароза 4В	1069
3-Окостерон- Δ^4 - Δ^5 -изомераза (КФ 5.3.3.1) из <i>Pseudomonas</i> <i>testosteroni</i>	19-Нортестостерон-17-О-гемисулфинат	Сефароза 4В с диаминодипропиламином	101
Пенициллиназа из <i>B. licheniformis</i>	Цефалоспорины с Конканавалином А	Сефароза 4В	234
Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)	Антитела Конканавалина А	Полимер конканавалина А, полученный с помощью глутаральдегида	51
— (из хрена)	2-Амино-6,7-диметил-4-окси-5,6,7,8-тетрагидроптерин	Биогель Р-300 с глутаральдегидом	1167
Фенилаланингидроксилаза (КФ 1.14.16.1)		Конкавалин А — сефароза	1238, 140
— из <i>Mosca trus</i>		СН-сефароза 4В	231
L-Фенилаланин: тРНК-лигаза из <i>Escherichia coli</i>	L-Фенилаланин	Сефароза 4В с метиловым эфиром ϵ -аминокапроновой кислоты, гидразинном и снова метиловым эфиром ϵ -аминокапроновой кислоты	232
Плазмамембранные ферменты в желчи (щелочная фосфатаза, 5'-нуклеотидаза, щелочная фосфодиэстераза I и L-лейцин- β -нафтиламидаза)	Конканавалин А	Сефароза 4В	369
Фосфатазы			525
Щелочная фосфатаза (фосфогидролаза ортофосфорного моноэфира, КФ 3.1.3.1) из плаценты человека	L-Фенилаланин	То же	281
	Антитела к ферменту	Сефароза 2В	906
	Иммуноглобулиновая фракция антисыворотки к ферменту	То же	510
-- (кишечника теленка)	4-(<i>n</i> -Аминофенилазо)фениларсиновой кислоты	Сефароза 4В с тирамином	141

— — из печени человека	1) Конканавалин А; 2) диазониевая соль 4-(<i>п</i> -аминофенилазо)фенил-арсиновой кислоты	1) Сефароза 4В; 2) тираминил—сефароза 4В	642
Мембраносвязанная F ₁ аденозин-трифосфатаза (КФ 3.6.1.3) из <i>Micrococcus</i> Sp. ATCC 398E	Конканавалин А	Конканавалин А — сефароза	1192
Фосфатаза фосфорилазы (КФ 3.1.3.17)	6-[(3-Карбокси-4-нитрофенилтио)-9-β-D-рибофуранозил	Сефароза 4В с иминобиспропилами-нил-N-ацетилгомоцистеином	547
Фосфопротеинфосфатаза из коры надпочечников быка	Гексаметилендиамин	Сефароза	139
Фосфодиэстераза	АТР	Сефароза 4В с ε-аминокапроновой кислотой	1211
Фосфорилазы	О-(4-Аминофенил)-О'-фенилтиофос-фат	Сефароза 4В	305
ADP-глюкозопирофосфорилаза	P ¹ -(6-Фосфо-1-гексил)-P ² -(6-амино-1-гексил)пирофосфат	То же	483
Глюкансинтезирующая фосфорила-за (КФ 2.4.1.1), изотим из <i>Oscillatoria princeps</i>	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	375
Гликогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1)	Алкиламин	Сефароза 4В	330
— из полиморфоядерных лейкоци-тов человека	Алканы	То же	1048
— из жировой ткани свиньи	5'-AMP	5'-AMP—сефароза	1099
Мальтодекстринфосфорилаза из <i>E. coli</i> (КФ 2.4.1.1)	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-5'-мо-нофосфат	Сефароза 4В	793
Фосфорилаза b	N- <i>п</i> -Сульфамилфенилгликозид	То же	1168
Полинуклеотидфосфорилаза (КФ 2.7.7.8) из <i>Escherichia coli</i>	Бутиламин	Сефароза	587
— из <i>Escherichia coli</i> и <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Полнадениловая кислота	»	696
Полигалактуроназа	<i>п</i> -Аминофениллоготимидилат	Сефароза 4В	1088
	Полигалактуронат натрия	Полигалактуронат натрия, сшитый эпихлоргидрином	366

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Полимеразы ДНК-зависимая РНК-полимераза из тимуса теленка и печени крысы — А из млекомы мыши ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7) из вируса миелобластома птиц — из <i>Escherichia coli</i> — I из <i>Escherichia coli</i> — из <i>Micrococcus luteus</i> — из клеток HeLa — 7,1 S из ядер и цитозоля клеток регенерирующей печени — из куриного эмбриона — (ядерная и митохондриальная) — клеточная и вирусная — I и II из <i>Escherichia coli</i> Полимераза полинуклеотидной кисло- ты из листьев табака РНК-зависимая ДНК-полимераза — — из опухолевых РНК вирусов РНК-полимераза (КФ 2.7.7.6) из <i>Escherichia coli</i>	Денатурированная ДНК тимуса те- ленка Полиадениловая кислота Полицитидиловая кислота Олигомер дезоксириботимидилата ДНК Пирановый сополимер (дивиниловый эфир малеинового ангидрида) Денатурированная ДНК То же Полинуклеотиды Однонитевая ДНК Дрожжевая РНК Олигодезокситимидиловая кислота (длина цепи 12—18 нуклеотидов) Антитела к ферменту Однонитевая ДНК ДНК Гепарин	Сефароза » Сефароза 4В Целлюлоза Сефароза 4В Целлюлоза Акриламид Сефароза 4В Целлюлоза Гидразин-сефароза Целлюлоза КМ-целлюлоза Сефароза 4В 4%-ная агароза (для электрофореза) Сефароза 2В Целлюлоза Сефароза 4В 4%-ная агароза (для электрофореза) 2%-ная агароза Сефадекс G-200 Сефароза 2В Сефароза 4В	1254 469 762 600 37 1215 723 177 913 742 207 155 918 597 1011 143 417 1262 727 1011 851 949 37 1119

Пролилгидроксилаза [пролилглицил-пептид, 1-оксoglутарат ; кислород-оксидоредуктаза (4-гидроксилирующая), КФ 1.14.11.2]	Поли-(L-пролин)	То же	1204
Протеиназы, пептидазы и их зимогены			
Кислая протеиназа из <i>Aspergillus awamori</i> (аваморин)	Метилловые эфиры ϵ -аминокапро-нил-D-фенилаланина или ϵ -аминокапронил-L-фенилаланил-D-фенилаланина	» »	1116
— — из <i>Aspergillus saitoi</i>	Моно-N-ДНФ-гексаметилендиамин хлоргидрат	» »	1115
— — из видов <i>Mucor</i>	N,O-Дибензилоксикарбонил-L-тиро-зин	АН-сефароза 4В	1152
Акрозин (трипсиноподобный фермент) из сперматозоидов ка-бана	Конканавалин А	Конканавалин А — сефароза	947
	Ингибитор трипсина из соевых бобов	Соевый ингибитор трипсина — целлю-лоза (Merck)	363
	Gly Gly—Tyr(O—Bzl)—Arg	Агароза—Gly—Gly—Tyr(O—Bzl)—Arg	410
D-Аланинкарбоксипептидаза	Бензамидин	Аминоалкилцеллюлоза	1019
— из <i>Bacillus subtilis</i>	6-Аминопенициллановая кислота	Сефароза с 3,3'-диаминопропилами-ном и янтарным ангидридом	127, 123
— из <i>Escherichia coli</i>			128
Щелочная протеиназа (КФ 3.4.21.14) из <i>Bacillus subtilis</i>	α -Аминобензилпенициллин	Сефароза 4В	436, 437
— — из <i>Aspergillus oryzae</i>	Карбобензоксиг-L-фенилаланил-D,L-лейцин	Сефароза 4В с триэтилтетраамином и янтарным ангидридом	397
Аминопептидаза из <i>Streptomyces griseus</i>	Овоингибитор	Сефароза	356
— из <i>Aeromonas proteolytica</i>	1,6-Диаминогексан	Сефароза 4В	1232, 1233
— из <i>Aspergillus flavus</i>	N-(3-Амино-5-метил-2-оксогексил)-янтарная кислота	Аминометилцеллюлоза	632
Фермент, превращающий ангиотен-зин I (пептидилпептидгидрола-за, КФ 3.4.15.1) из легкого кро-лика	D-Лейцин	Сферон 300 с гексаметилендиамином	1208
	Гиппурилгистидиллейцин	Сефароза 4В с гексаметилендиамином	848

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Щелочная протеиназа из <i>Bacillus subtilis</i> 504	Микробной щелочной протеиназы ингибитор S-SI	Сефароза 4В	1007
Карбоксипептидазы А и В	ε-Амино- <i>l</i> -капроил-D-триптофан	То же	940, 941
Карбоксипептидаза А (пептидил-L-аминокислота гидролаза, КФ 3.4.12.2)	Глицил-D-фенилаланин	Аминоалкилсилил-стекло	961
Карбоксипептидаза В (пептидил-L-лизингидролаза, КФ 3.4.12.3)	ε-Аминокaproил-D-триптофан	Аминоэтилцеллюлоза	1212
	L-Тирозин-D-триптофан	Сефароза 4В	940
		То же	248
	D-Аланил-L-аргинин	Сефароза	1096
	Глицил-D-фенилаланин или глицил-D-аргинин	Аминоэтилцеллюлоза	1212
— из активированного сока поджелудочной железы быка	D-Триптофан	Сефароза 4В с ε-аминокапроновой кислотой	1095
-- G-1	Антисыворотка к карбоксипептидазе G-1	Сефароза 2В	229
Катепсин В ₁ (КФ 3.4.22.1)	1-Аминофенилртути(II)ацетат	Сефароза 4В	626
Катепсин С (КФ 3.4.14.1)	То же	То же	627
Катепсин D (КФ 3.4.23.5) из селезенки и тимуса быка	Гемоглобин	Сефароза 4В или биогель А-5m	1091
α-Химотрипсин (КФ 3.4.21.1)	Метилловый эфир ε-аминокaproил-D-триптофана	Сефароза 4В	248
— из папанового гидролизата химотрипсина			1055,
— (свиньи)	Метилловый эфир N-ε-аминокaproил-D-триптофана или фенил-4-бутиламин	То же	150, 1180
	4-Фенилбутиламин	» »	1180
	Глицил-D-фенилаланин	Аминоэтилцеллюлоза	1212
	Карбобензоксиг-L-фенилаланин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном	396
	Бензилоксикарбонилглицил-D-фенилаланин или бензилоксикарбонилглицил-D-лейцин	Сфераон 300 с гексаметилендиамином	1206

	Бензилхлорид	Сефароза 2В с 2,3-дибромпропанол-1	669
	N-Акрилоил-6-аминогексанол- и N-акрилоил-4-аминобутирилпроизводные метилового эфира α -азафенилаланина	Полимеры на основе полнакриламида	69
	Овомукоид индейки	Сефароза 2В	353
	Ингибитор трипсина	Сферон 300	1207
	Микробной щелочной протеиназы ингибитор S-SI	Сефароза 4В	1007
α -Химотрипсин и трипсин из экстракта поджелудочной железы	Ингибитор трипсина из соевых бобов	6%-ная агароза	915
Химотрипсиноген А и Х, химотрипсин, сывороточный альбумин, овальбумин, β -лактоглобулин и лизоцим	α -Алкиламины с различной длиной цепи	Сефароза 4В	520, 521
Химотрипсинподобные ферменты	4-Фенилбутиламин	То же	1120
Коллагеназа <i>Clostridium histolyticum</i> (кlostридиопептидаза А, КФ 3.4.24.3)	Эластин, обработанный щелочью	Эластин, обработанный щелочью	1045
Клострипаин (кlostридиопептидаза В, КФ 3.4.22.8) из <i>Clostridium histolyticum</i>	Бутилендиамина	Сефароза 4В	664
Коллагеназа А (кlostридиопептидаза А, КФ 3.4.24.3) из <i>Clostridium histolyticum</i>	Гептилендиамина	То же	664
Коллагеназа (кожи человека, ревматоидной синовиальной жидкости и головастика)	Коллаген	» »	79, 80
— (позвоночных)	Гепарин	BrCN-активированная сефароза 4В	320
— (кости мышцы)	Соевый ингибитор	Соевый ингибитор-КМ-целлюлоза, аффинный сорбент	997
Эндогенная протеиназа черного гороха	α -Аминобензамидин	Сефароза 4В с глицилглицином	414
Энтерокиназа (свиная, КФ 3.4.21.9)	Конканавалин А	Сефароза 4В с глицилглицином	442
— свободная от кишечной аминопептидазной активности	α -Аминофенилртути(II) ацетат	Конканавалин А—сефароза	70
Фицин (КФ 3.4.22.3)	Антитела к группе пепсиногена I	Сефароза 4В-200	24
Протеиназы желудка человека (группа пепсиногена I)		Сефароза 4В	1322

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Инсулинспецифичная протеиназа	Инсулин	Агароза	293
Калликреин и плазмин	Трипсин-калликреиновый ингибитор	Сополимер малеиновой кислоты и этилена	381
Калликреин (КФ 3.4.21.8) (свиньи и человека)	Соевый ингибитор	КМ-целлюлоза	388
— (свиньи)	Гуанидированный трипсин-калликреиновый ингибитор	То же	382
Нейтральная протеиназа (КФ 3.4.24.4) из <i>Bacillus subtilis</i>	Карбобензоксиг-L-фенилаланил-DL-лейцин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном и янтарным ангидридом	397
Нейтральная и щелочная протеиназы из <i>Bacillus subtilis</i>	Карбобензоксиг-L-фенилаланин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном	396
Нейтральные металлоэндопептидазы из <i>B. subtilis</i> , вариант <i>amylosacchariticus</i>	Фосфоамидон	АН-сефароза 4В	641
— — из <i>Streptomyces griseus</i> K-1	Глициллеппин	Сефароза 4В с ϵ -аминокапроновой кислотой	641
— — из <i>Clostridium histolyticum</i>	Ацетил-D-фенилаланин	Сефароза 4В с этилендиаминном, янтарным ангидридом и триэтилентетраминном	1101
— — из <i>Bacillus subtilis</i>	Глицил-D-фенилаланин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном	1244
Папайн (КФ 3.4.22.2)	Gly—Gly-L-Tyr (O-Bzl)—L-Arg L-Аминофенилртукури(II) ацетат	Сефароза 4В	125, 126
— из сухого латекса папайи	Глутатион-2-пиридилдисульфид	То же	1084, 1085
Пепсин (КФ 3.4.23.1)	Поли-L-лизин	Сефароза 2В	145, 146
— свиньи	Метилловые эфиры ϵ -аминокапроил-D-фенилаланина или ϵ -аминокапроил-L-фенилаланил-D-фенилаланина	Сефароза 4В	838
— (хуриный)	Ингибитор пепсика из <i>Ascaris lumbricoides</i>	То же	1116
		» »	625

— из переднего желудка курицы	л-Аминофенилмеркури(II) ацетат	» »	624
Пепсин и пепсиноген	Моно-N-ДНФ-гексаметилендиамин-хлоргидрат	» »	1115
Группа пепсиногена II из слизистой желудка	Антитела к пепсиногену II	» »	777
Плазминоген (зимоген протеолитического фермента плазмнна, КФ 3.4.21.7) из плазмы крови человека	L-Лизин моногидрохлорид	» »	274, 275
— из плазмы крови человека фракции III и III ₂ , цельной плазмы, сыворотки, плазменного зуглобулина			274, 275
— из плазмы крови человека			1130,
— (человека)	DL-Лизин	Биогель Р-300 с гидразидом	1131
	L-Лизин	Сефароза	948
		Сефароза 4В	725
			147,
— из плазмы			1246, 834
Плазминоген (человека)	Бутил-л-аминобензоат (бутезин)	» »	205
— (быка, человека и овцы)	То же	» »	205
— (кролика)		» »	1324
PMN-лизосомальная эластаза	Лизин	Сефароза	1323
	ε-Аминокапронил-L-аланил-L-аланил-L-аланин	BrCN-активированная сефароза	479, 480
Прекаллинкреин	L-Аргинин моногидрохлорид	Сефароза 4В	581
Прокاربоксипептидаза В из <i>Protopterus aethiopicus</i>	Металловый эфир ε-аминокапронил-D-триптофана	Сефароза	1138
Протеиназы из солода пшеничной муки	Гемоглобин	Сефароза 4В	939
Протеиназа II из <i>Escherichia coli</i>	N-Ацетил-D-аргинин	АН-сефароза 4В	211
Протеолитические ферменты из экстрактов поджелудочной железы быка	Соевый ингибитор трипсина и овомукоид	Полимер из аффинных лигандов, полученный сшиванием глутаральдегидом	881
— — из кровяных пластинок человека	Эластин	Целлюлоза	51
Протромбин (быка)	Иммуноглобулиновая фракция антипротромбина	Сефароза 4В	695
			1243

Выделенные вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Эластаза <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Метилловый эфир ϵ -аминокапроил-D-фенилаланина	Сефароза	801
Птероил-олиго- γ -L-глутамилэндо- пептидаза из кишечника кур	γ -Олиго-L-глутамат	Сефароза 4В	992
Ренин (КФ 3.4.99.19)	Синтетические γ -олигоглутамильные пептиды	То же	993
— из почек свиньи	Пепстатин (N-ацелированный пентапептид из актиномицетов структуры: изовалерил-L-валил-L-валил-4-амино-3-окси-6-метилгепта- ноил-L-аланил-4-амино-3-окси-6-метилгептановая кислота)	Аминоэтил—биогель Р-150	820
Ренин (человека и свиньи)	N Оксисукцинилпепстатин	Сефароза с гексаметилендиамином	276
— (свиньи)	Метилловый эфир лейциллейцилвалил- тирозина и метилловый эфир лей- циллейцилвалилфенилаланина	Сефароза 4В с гексаметилендиамином (или другими пространственными группами)	277
— из плазмы крови собаки	His Pro—Phe—Leu-D-Leu—Val—Tyr	Сефароза с гексаметилендиамином	230
Кислая протениназа сорго	Козьи антирепиновые γ G-глобулины	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламином и янтарным ангидридом	819
Бромеланин стебля	D-Глутамил-D-глутаминовая кислота	Сефароза 4В	752
Стрептококковая протениназа	Метилловый эфир N-(ϵ -аминокапроил)-D-триптофана	BrCN-активированная сефароза 4В	919
Трипсин <i>Sfrentomyces griseus</i>	n-Аминофенилртутери(II)ацетат	Сефароза 4В	1245
	1,6-Диамингексан	То же	1228
	Олигопептиды, содержащие в качестве карбоксилконцевого остатка L-аргинин, полученные из трипсинового гидролизата протаминна	» »	129
		» »	648
		» »	1232
		» »	1233
		» »	616

Субтилизиноподобный фермент из препаратов карбоксипептидазы Сульфгидрильная протеиназа из бобов Термолизин (группы КФ 3.4.24.4)	Трипсиновый гидролизат сальмина Антителя к субтилизину	» » Целлюлоза	1308 1125
	Ртутное производное метакриланили- да (Hg-MAA)	Оксиалкилметакрилатный гель с 15% МЛА	1209
	Апетил-D-фенилаланин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном, янтарным ангидридом и триэти- лентетраминном	887
Тромбин (бычий, КФ 3.4.21.5)	Глицил-D-фенилаланин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном	1244
	Карбобензокси-L-фенилаланил-DL- лейцин	Сефароза 4В с триэтилентетраминном и янтарным ангидридом	397, 396
	Фосфорамидон-N-(α -L-рамнопирапо- зидоксигидроксифосфинил)-L- лейцил-L-триптофан	АН-сефароза 4В	641
	ϵ -Аминокапроил- <i>п</i> -хлорбензамид хлоргидрат	Биогель 1,5м	1174
	<i>п</i> -Аминобензамидин	Агароза 15м с ϵ -аминокапроиновой кислотой	1020
Тромбины (человека, кролика и быка) — (человека, КФ 3.4.21.5)	<i>м</i> -Аминобензамидин	Биогель А-5м с гексаметилендиамин- ном и янтарным ангидридом	503, 504
	L-Лизин	Сефароза 4В	481
Тромбиноподобный фермент из яда змеи α - и β -трипсин (КФ 3.4.21.4)	<i>п</i> Хлорбензиламин	Сефароза 4В с ϵ -аминокапроиновой кислотой	1171
	<i>п</i> -Аминобензамидин	Сефароза 4В с диаминодипропил- аминосукцинатом	527
Трипсин	<i>п</i> -(<i>п'</i> -Аминофеноксипропокси)бенз- амидин	Сефароза 4В или целлюлоза	578, 579
	<i>п</i> -Аминофенилгуанидин или <i>п</i> -амино- бензамидин или <i>м</i> -аминобензами- дин	Биогель А-5м с сукцилированным 1,6-диаминогексаном или сефаро- за 6В с ϵ -аминокапроиновой кис- лотой	503, 504
β -Трипсин	Овомуконд	Сефароза 2В	352, 353
	Куриный овоингибитор	Биогель А-15м	89
	Сосвый трипсиновый ингибитор или ингибитор картофеля	<i>п</i> -Диазобензоилцеллюлоза	814

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
β-Трипсин (бычий, полностью свободный от α-трипсина) (α,β,ψ)-Трипсин (α, β)-Трипсин	Соевый трипсиновый ингибитор (СТИ)	СТИ, сшитый с N-этил-5-фенилизоксазол-3'-сульфонатом (реагент К Вудворда)	78
		Флороглюцинол—гидроксированная агароза	916
		Сефароза 4В	709 711
	Овомукоид	Сефароза 6В с диглицидным эфиром	1134
	Ингибитор трипсина (ингибитор Кунитца)	Сефароза 4В То же	965 191
Трипсин из морской звезды <i>Pisaster brevispinus</i>	Ингибитор бобов лимы	Азидная форма сефарозы 4В после окисления периодатом натрия и реакции с дигидразидом адипиновой кислоты	605
— и родственные ферменты — в комплексе с динитрофенилированным ингибитором трипсина из соевых бобов — и эластазы Трипсиноподобный фермент из <i>Streptomyces paromomycinus</i> (паромотрипсин) Урокиназа (КФ 3.4.99.26)	Пептиды, содержащие L-аргинин на С-конце	Сефароза 4В	428
	Глицилглицил-L-аргинин	То же	615
	Антидинитрофенильные антитела	» »	667 1282
	Протеиназный ингибитор бобов лимы	» »	710
	Панкреатический трипсиновый ингибитор Кунитца	» »	193
Протоколлагенпролингидролаза	α Бензилсульфонил-L-аминофенил-аланин	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном, янтарным ангидридом и снова гексаметилендиаминном	745
	L-Аминобензамидинхлоргидрат Восстановленный и карбоксиметилированный коллаген	СН-сефароза 4В Биогель А-5m	529 103

Пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1) из <i>B. stearothermophilus</i>	Авидин	Сефароза 4В	704
Редуктазы			
Альдегидредуктаза (КФ 1.1.1.1) из мозга	NADP	Сефароза	1146
Дигидрофолатредуктаза (Т ₄ -бактериофагспецифическая)	N ¹⁰ -Формиламиноптерин (4-амино-10-формилптеромглутамат)	Биогель Р-150 с этилендиаминном	332
Дигидрофолатредуктаза (5,6,7,8-тетрагидрофолат: NADP ⁺ -оксидоредуктаза, КФ 1.5.1.3)	Метотрексат	Сефароза 4В с 1,6-диаминогексаном	839, 621
	Птеридин	Сефароза	830
	Амегтоптерин	Алкил-агароза	254
	10-Формиламиноптерин	Сефароза с гексаметилендиаминном	1267
	Окисленный глутатин	Сефароза 4В с этилендиаминном	938
Глутатионредуктаза из хрусталика глаза человека, сетчатки овцы и эритроцитов человека		Сефароза 4В	473
	N ⁶ -(6-Амкногексил)аденозин-5'-монофосфат или N ⁶ -(6-аминогексил)аденозин-2',5'-бисфосфат	То же	148
NADPH-цитохром с (цитохром Р-450) редуктаза (КФ 1.6.2.4)	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-2',5'-бисфосфат	2',5'-ADP-сефароза 4В	1305
Нитратредуктаза [NAD(P)H: нитрат-оксидоредуктаза, КФ 1.6.6.2]	Флавинмононуклеотид NADH	Целлюлоза	623
Нитритредуктаза (ферредоксин-нитрит-оксидоредуктаза, КФ 1.6.6.4) из зеленого шпината	Ферредоксин (шпинат)	Сефароза	492
Индукцируемая фагом Т4 рибонуклеотидредуктаза		Сефароза 4В	555
Рибонуклеозиддифосфатредуктаза из <i>Escherichia coli</i>	n-Аминофениловый эфир dATP	То же	108
Рибонуклеотидредуктаза из <i>Lactobacillus leichmannii</i>	5'-О-Тозиладенозин		107
		Сефароза 4В-200 с дианокобаламином-аминододециламидом	1300

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из <i>Escherichia coli</i>	<i>p</i> -Аминофенил-АТФ и <i>p</i> -аминофенил-дАТФ	Сефароза 4В	109
из <i>Lactobacillus leichmannii</i>	Р ³ -(6-Аминогексил-1)дезоксигуанозин-5'-трифосфат	То же	518
Обратная транскриптаза из опухолевого РНК вируса мышинного типа С	Антитела	» »	726
Рибонуклеазы			
73-Аминотирозилрибонуклеаза (панкреатическая)	5'-(4-Аминофенилфосфорил)уридин-(2')3'-фосфат	» »	438
Рибонуклеаза А (бычья панкреатическая, КФ 3.1.4.22)	То же	» »	1281
— (бычья панкреатическая)			1283
— (свиная панкреатическая)		Агароза-APUP	1275
— (табака)	5'-(4-Аминофенилфосфорил)гуанозин-2'(3')-монофосфат	Сефароза 2В	592, 593, 1127
— T ₁	То же	Стекло с 1,5-диоксинафталином	594
— L из <i>Aspergillus</i> sp.	5'-AMP	Сефароза 4В с гексаметилендиамином	540
— из <i>Escherichia coli</i>	ДНК	8%-ная агароза (для электрофореза)	1253
— III из <i>Escherichia coli</i>	Двунитевая РНК	Агароза — гексан — поли(1)-поли(С)	301
— из селезенки человека	Антисыворотка к РНКазе печени человека	ВгCN-активированная сефароза 4В	837
— из печени человека	Поли-(G)	То же	373
Изозимы бычьей панкреатической рибонуклеазы	1) N ⁴ -(6-Аминогексил)цитидин-2'(3')-монофосфорная кислота; 2) конканавалин А	1) Активированная СН-сефароза 4В; 2) конканавалин А — сефароза	87
Вторичная моноаминоксидаза [вторичный амин, NAD(P)H:кислород оксидоредуктаза (N-деалкилирующая), КФ 1.14.99.9] из <i>Pseudomonas aminovorans</i>	NADH	Сефароза 4В с ϵ -аминокапроковой кислотой	152

Стрептокиназа	Антистрептокиназный γ -глобулин	Агароза	566
Стероид- Δ^4 -изомераза (3-кетостероид- Δ^4 - Δ^5 -изомераза, КФ 5.3.3.1) из <i>Pseudomonas testosteroni</i>	19-Нортестостерон-17-О-гемисукцинат	Диаминодипропиламино-сефароза 4В	101
Синтазы и синтетазы			
Аминоацил-тРНК-синтетаза — (палиновая)	Гексаметилендиамин Специфическая тРНК	Сефароза 4В	574
Антранилатсинтазный комплекс из <i>Salmonella typhimurium</i>	L-Тринтофан	BrCN-активированная сефароза с дигидразидом адипиновой кислоты	601
Хоризматсинтаза из <i>Neurospora crassa</i>	Фосфат	Сефароза 2В	760
Цитратсинтаза (КФ 4.1.3.7) из сердца свиньи	№. [(6-Аминогексил)карбамилметил] АТР	Фосфоцеллюлоза	220
— из сердца крысы	АТР, окисленный периодатом	Сефароза 4В	716
3-Дезокси-D-арабиногептулозо-7-фосфатсинтетаза (КФ 4.1.2.15)	L-Тирозин	Сефароза 4В с дигидразидом адипиновой кислоты	818
— изоэзимы из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Сефароза 4В	186, 187
Дигидроптероатсинтаза (КФ 2.5.1.15)	Сульфонамид		1147
D-Эритродигидроптероинтрифосфатсинтетаза из <i>Lactobacillus plantarum</i>	GTP, окисленный периодатом	Сефароза 4В с ди-(3-аминопропил)-амином	1127
Синтетаза жирных кислот из печени голубя	ϵ -Аминокапроилпантотеин	Сефароза 4В с метиловым эфиром ϵ аминокaproновой кислоты и гидразингидратом	573
Глутаминсинтетаза [L-глутамат: аммиак-лигаза (ADP-образующая), КФ 6.3.1.2] из <i>Escherichia coli</i>	Пентаметилендиамин	Сефароза	929
— из <i>Neurospora crassa</i>	Антраниловая кислота	Сефароза 4В	1049
Гликогенсинтаза (UDP-глюкоза: гликоген- α 4-гликозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11)	Конканавалин А	СН-сефароза 4В	883
— из экстракта мышц	Алканы	Конканавалин А — сефароза	1097
	Тетраметилендиамин	Сефароза 4В	1048
		То же	1051

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
L-Изолейцил-тРНК-синтетаза	N-трет-Бутилоксикарбонил-[U- ¹⁴ C]-L-изолейцинил-N ⁶ -(2-аминоэтил)-5-аденилат Изолейцил-тРНК	Биогель А-15 с 3,3'-аминобиспропил-амином и янтарным ангидридом	932
α -Изопропилмалатсинтаза [α -изо-пропилмалат- α -кетонизовалерат-лаза (CoA-ацетилирующая), КФ 4.1.3.12]	Лейцин	Сефароза 4В с тетраметилендиамином и бромуксусным эфиром N-оксисукцинимида Сефароза	77 282, 283
Лактозосинтаза из молока человека Лейцил-тРНК-синтетаза [L-лейцин-тРНК-лигаза (AMP), КФ 6.1.1.4]	α -Лактальбумин Лейциновая тРНК	Сефароза 6В Сефароза 4В	31 486
Легкий и тяжелый ферменты син-тетазы грамицидина S	Пролин	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропил-амином	893
Метионил-тРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.10)	Метионин	Сефароза 4В с гексаметилендиами-ном	959, 960
Мноинозитол-фосфатсинтаза [1L-мноинозитол-1-фосфат-лаза (изомеризирующая) КФ 5.5.1.4]	NAD	Сефароза 4В с γ -аминокапроновой кислотой	908
— из эритроцитов кур и <i>Lemna gibba</i>			1031
Фенилаланил-тРНК-синтетаза — из <i>Salmonella typhimurium</i>	Фенилаланиновая тРНК L-Фенилаланин	Сефароза 4В с гидразином Сефароза 4В с тетраметилендиами-ном	944 1018
3-sn-Фосфатидил-1'-sn-глицеро-3'-фосфатсинтетаза из мембран <i>Bacillus licheniformis</i>	Окисленный цитидинфосфо-sn-1,2-диацилглицерин	Сефароза 4В с дигидразидом адипи-новой кислоты	681
Белок лактозосинтазы (КФ 2.4.1.22)	α -Лактальбумин	Сефароза 4В	1187, 1191, 1188

Рибофлавинсинтаза (КФ 2.5.1.9)	6-Карбоксиэтил-7-оксо-8-D-рибитил-люмазин	То же	665
Тимидилатсинтаза	6-п-Аминобензамидогексилдезоксн-уридин-5-фосфат	Сефароза 4В-200	253
— из <i>Lactobacillus casei</i>	2'-Дезоксиуридин-5'-(6-п-аминобензамидо)гексилфосфат	Сефароза	252
— из <i>Escherichia coli</i> В	5-Фтор-2'-дезоксиуридин-5'-(п-аминофенилфосфат)	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном и янтарным ангидридом	1268
Трегалозофосфатсинтаза из <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Тетрагидрометотрексат	Сефароза 4В с этилендиаминном	1080
Триптофансинтаза (L-серингидролиза, присоединяющая нидол, КФ 4.2.1.20)	Гепарин	Сефароза 4В	322
Триптофанил-тРНК-синтаза	Индолпропионовая кислота	ВгCN-активированная сефароза 4В с гексаметилендиаминном	1294
Тирозил-тРНК-синтаза (КФ 6.1.1.1)	Триптофан	Сефароза 4В с этилендиаминном	1062
— из пекарских дрожжей	4-Нитрофениловый эфир трет-бутил-оксикарбонил-О-бензил-L-тирозина	Сополимер маленного ангидрида и бутандиолдвинилового эфира с 1,6-гександамином	94
Серил-тРНК-синтаза	Тирозин	То же	95
Валиновая и лизиновая специфичные синтазы	Серил тРНК	Сефароза 4В	92
Val-, Trp-, Phe-, Leu- и Ile-тРНК-синтазы	Фракции тРНК, обогащенные валиновой и лизиновой специфичными акцепторными активностями	Полиакрилгидразидный агаровый гель	835
Валил-тРНК-, триптофанил-тРНК- и серил-тРНК-синтазы из семян желтого люпина (<i>Lupinus luteus</i>)	Нефракционированная тРНК люпина	Сефароза 4В с гидразином	576
Трансферазы	Люпиновая тРНК, окисленная периодатом	ВгCN-активированная сефароза 4В с гидразином	575
Ацетилтрансфераза из <i>Escherichia coli</i> (инактивирующая гентамицином)	Гентамицин Cl или канамицин А	Индубиоза 4А	692—694
Антранилатфосфорибозилтрансфераза	Антраниловая кислота	Сефароза 2В с гексаметилендиаминном и янтарным ангидридом	759
Аспартат-аминотрансфераза (L-аспартат:2-оксоглутарат-амино-трансфераза, КФ 2.6.1.1)	Пиридоксаль-5'-фосфат	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном	987

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Аспартат аминотрансфераза	L-Аспарагин с 3-кетоглутаровой кислотой	АН-сефароза 4В	1016
АТР: глутамин синтетаза (аденилаттрансфераза, КФ 2.7.7.42) из <i>Escherichia coli</i>	Пентаметилендиамин	Сефароза 4В	1049
Катехол-О-метилтрансфераза	3,4-Диметокси-5-оксифенилэтиламин	Сефароза 4В с диаминпропиламин и янтарным ангидридом	136
- из печени крысы	Катехол	Сефароза 4В с м-фенилендиамином после диазотирования	459
Хлорамфениколацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.28)	Восстановленный хлорамфеникол	Сефароза 4В	458
	Хлорамфеникол	BгCN-активированная сефароза с $H_2N-(CH_2)_nCOOH$	1320
Холин ацетилтрансфераза (ацетил-CoA: холин-О-ацетилтрансфераза, КФ 2.3.1.6)	Антисыворотка	Антисыворотка, полимеризованная с помощью глутаральдегида	979
Холинфосфат-нитидилтрансфераза (КФ 2.7.7.15) из печени крысы	N-Карбоксибензил-4-(м-бромстирил) пиридинийхлорид	Аминоалкилсукцинимидноалкил-сефароза 4В	550, 551
Коллаген-галактозилтрансфераза	Глицеринфосфорилхолин	Эпоксинактивированная сефароза 6В	208
Коллаген-глюкозилтрансфераза	Денатурированный цитратно-растворимый коллаген	Сефароза 4В	953
Фермент, разрушающий разветвления полисахаридов (амило-1,6-глюкозидаза и олиго-1,4→1,4-глюкантрансфераза, КФ 3.2.1.33 и КФ 2.4.1.25)	USP-глюкуроновая кислота	АН-сефароза 4В	35
Галактозилтрансфераза (UDP-галактоза: N-ацетилглюкозамин-галактозилтрансфераза, КФ 2.4.1.22)	Тетрамтилендиамин	Сефароза 4В	1160
	P ¹ -(6-Аминогексил-1)-P ² -(5'-уридин) пирофосфат или 6-амино-1-гексил-2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкопиранозид	То же	68
	α-Лактальбумин	» »	778, 1187

	N-Ацетилглюкозамин	» »	67
	L-Аминофенил-N-ацетил-β-D-глюкозамин	BrCN-активированная сефароза	104
из снятого коровьего молока	Норлейцин, UDP и α-лактальбумин	Сефароза 4В или сефароза 4В с гексаметилендиамином (UDP)	416
Глутамат-формиминотрансфераза (КФ 2.1.2.5)	Тетрагидрофолат	Сефароза 4В с гексаметилендиаминном	1081
γ-Глутамилтрансфераза (КФ 2.3.2.2) из почек крысы	Конканавалин А	Сефароза 4В	1148
Гликозилтрансферазы	Уридиновый, адениновый или гуанозиновый нуклеотиды	То же	1054
L-Гистидинолфосфат-аминотрансфераза (КФ 2.6.1.9) из <i>Salmonella typhimurium</i>	L-Гистидинолфосфат	» »	1052
Гипоксантин : гуанинфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.8)	Гексаметилендиамин	» »	495
Лецитин : холестерин-ацилтрансфераза	Иммуноглобулины к ферменту	» »	90
Неоминифосфотрансфераза из <i>Escherichia coli</i>	Липопротеин высокой плотности	Сефароза 2В	9
Нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.6)	Неоминин	BrCN-активированная сефароза 4В	407
Фосфатацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.8)	6-(L-Аминобензиламинопурин	Сефароза с м-фенилендиамином	170
РНК (гуанин-7)-метилтрансфераза из клеток HeLa	Кофермент А	Сефароза 6В	203
Тирозин-аминотрансфераза (L-тирозин : 2 кетоглутаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.5)	ДНК	Агароза	325
	Пиридоксаминфосфат	Сефароза 4В с этилендиамином и сукцинированная	795
		Сефароза 4В с 3,3'-диаминопропиламином и янтарным ангидридом	1170
Ксилозилтрансфераза (UDP-D-ксилоза : коровый белок-β-D-ксилозилтрансфераза)	Протеогликан (деградированный по Смитсу) или коровый белок из протеогликана хряща	Сефароза 4В	1032, 1033
транс-N-Дезоксирибозилазы (КФ 2.4.2.6) I и II	6-Бензиламинопурин	Сефароза со связанным м-фенилендиамином	526

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Трансгидрогеназа из <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N ⁶ -(6-Аминогексил)-AMP	Сефароза	611
Липаза триацилглицерина (КФ 3.1.1.3) из жировой ткани человека	Диолеилглицерин	CN-сефароза 4В	1225
Триптофан-гидроксилаза (триптофан-5-монооксигеназа, КФ 1.14.16.4) из заднего мозга кролика	Метилловый эфир ϵ -аминокапроил-D-триптофана	BrCN-активированная сефароза 4В	1274
Тирозиназа из высших грибов	6-Фтортриптофан п-Азофенильное производное	Сефароза 4В Целлюлоза	1081 699
Тирозингидроксилаза (КФ 1.14.16.2) — из мозга барана	Диоксифенильное производное	Сефароза 4В	868
Уреаза из <i>Proteus morganii</i> и канавалии мечевидной (КФ 3.5.1.5)	3-Иодтирозин	То же	1061 911
	Оксимочевина	BrCN-активированная сефароза 4В с этилендиамном и янтарным ангидридом, повторенными дважды	1064
β -D-Ксилозидаза (<i>B. pumilus</i>)	2,2'-Дипиридиндисульфид п-Аминобензил-1-тио- β -D-ксилопиранозид	Сефароза 2В после тнолирования Сефароза 2В	171 213
<i>Субъединицы и модифицированные производные ферментов</i>			
Ацилтрипсин	Овомукоид	Сефароза 6В	813
Аффинная хроматография форм I и 2 Gly- и Lys-плазминогенов и плазминов человека	L-Лизин	Сефароза	1132
Алкилированная карбоксипептидаза В	L-Лейцил-D-аргинин	Сефароза 4В	910
Ангидрохимотрипсин	Ингибитор из лимы	Сефароза	14, 15
Ангидротрипсин	Соевый ингибитор трипсина	Сефароза 2В	13
α - и β -Ангидротрипсины	То же	То же	1319

Анионный трипсин из желудочного сока	Тразилол (природный ингибитор трипсина)	Сефароза 6В	1100
Апопротсин из глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы	Голубой декстран	BrCN-активированная сефароза	1173
Биотинсодержащие субъединицы карбоксилазы	Биоцитин (ϵ -N-биотинил-L-лизин)	Сефароза 4В	680
В1- и В2-субъединицы редуктазы из ДНК Г мутанта <i>Escherichia coli</i>	dATP	Сефароза	391
Фракции каталитической и регуляторной субъединицы протениназы из полиморфоядерных лейкоцитов человека	Гистон	Сефароза 4В	1203
Формы (а и b) фосфорилазы гликотена	α Алкиламин	То же	329
Фракции плазминогена кролика	L-Лизин	» »	1093
Фрагменты β -галактозидазы	n-Аминофенил- β -D-тиогалактопир-анозид	Аффиноза 202	1227
Частицы гликогена с адгезированными гликогенсинтетазой и фосфатазой синтетазы	Конканавалин А	Сефароза	1247
β -Гуанидированный трипсин	Овомукоид кур	Сефароза 4В	963
Модифицированная РНК-полимераза	ДНК	Целлюлоза	278
Молекулярные формы ацетилхолинэстеразы	1-Метил-9-[N γ -(ϵ -аминокапроил)- γ -аминопропиламино]акридиний-бромид бромгидрат	Сефароза	296
— — аргиназы из печени крыс	L-Лизин	Сефароза 4В	1158
Монокарбоксамидометильное производное карбоангидразы В эритроцитов человека	n-Аминометилфенилсульфониламид	То же	1269
Нативный, синтетический или оксидол-62-лизосим	N-Ацетилглюкозамин- β (1 $\rightarrow$ 4)трисахарид	» »	228
Нормальная и мутантная формы В ₂ субъединицы триптофансинтазы <i>Escherichia coli</i>	Иммуноглобулин G	Десульфатированная сефароза 4В, сшитая эпихлоргидрином	1053
Белок В1 из рибонуклеотидредуктазы <i>Escherichia coli</i>	dATP	Сефароза	1169
Регуляторная субъединица гистонкиназы мозга свиньи	8-(γ -Карбоксипропилтио)цикло-3',5'-аденозинфосфат	Сефароза 4В с полилизинном	1046

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Холофермент РНК-полимеразы	ДНК	Целлюлоза	817
Субъединицы ломбрицикиназы (КФ 2.7.3.5) из мышц <i>Lumbricus terrestris</i>	<i>п</i> -Аминофенилмеркури(II)ацетат	Сефароза 4В	271
— фенилаланил-тРНК-синтетазы	То же	То же	822
— синтетазы жирных кислот печени голубя	Пантетеин	Сефароза с ϵ -аминокапроновой кислотой	732
— транскарбоксилазы (метилмалонил-СоА-пируват-карбокситрансферазы, КФ 2.1.3.1)	Авидин	Сефароза 4В	105
<i>Гликопротеины и сахараиды</i>			
Гликопротеины группы крови I	Агглютинины анти-I	То же	357
Групповые вещества крови А	Фитогемагглютинин <i>Vicia cracca</i>	Сефароза 2В	654
Мозговой специфический гликопротеин из белого вещества мозга человека	Антитела против мозговых специфических белков	Сефароза 4В	157
Гликопротеины клеточной поверхности	Лектин из <i>L. culinaris</i> (специфичный к сахарам глюкозы и маннозы)	То же	1086
	Лектин из <i>R. communis</i> (специфичный к сахарам D-галактозы)	» »	1086
Конканавалин А-связывающие гликопротеины	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	1137
Сополимерные галактозаминогликаны	Дерматансульфат или он же после частичного окисления периодатом	СН-сефароза 4В или АН-сефароза 4В	374
Гликопротеин оболочки вируса лихорадки денге из мембран инфицированных клеток	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	1124
Галактоманнан из семян <i>Cassia alata</i>	α -D-Галактопиранозидсвязывающий лектин из <i>Bandeiraea simplicifolia</i>	Сефароза 4В	977

D-Галактоза из проростков <i>Phaeolus aureus</i>	8-β-Амнноэтилтоадеозинтрифос- фат	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипро- пиламином и янтарным ангидри- дом и N-оксисукцинимидом	184
Галактозосодержащие биополимеры	Галактозоспецифичный лектин из <i>Rici- nus communis</i>	Сефароза 4В	1136
Гликоген	Конканавалин А	Конканавалин А, полимеризованный глутаральдегидом	288
Гликофорин А (сиалогликопротеин) из мембраны эритроцитов чело- века	Агглютини́н зародышей зерен пше- ницы	Сефароза 4В	607
Гликопротеин и протеодерматансуль- фат из ахиллового сухожилия бы- ка	Конканавалин А	Конканавалин А -сефароза	25
Гликопротеины	Гликопептиды, полученные протеоли- тическим гидролизом различных гликопротеинов	Сефароза 2В или 4В	1044
— и нейтральные полисахариды	Конканавалин А	Сефароза 4В	653
Гликопротеины из сыворотки крови человека	L-Валин или L-норлейцин	То же	164
— из сыворотки крови человека или кролика	Конканавалин А	Сефароза 2В	44
— из микросомальных мембран пе- чени		Полимер конканавалина А, получен- ный с помощью глутаральдегида	51
Групповые вещества крови свиньи	» »	Конканавалин А—сефароза	1291
Мозговой специфический α ₂ -гликопро- теин человека	Мозговые специфические антитела	Конканавалин А, сополимеризованный с L-лейцин-N-карбоксангидридом или сефарозой 4В	729
¹²⁵ I-Меченый глюкозагон		Сефароза 4В	1250
Гликопротеины мембран лимфоци- тов плазмы крови	2-Окси-5-нитробензилированные анти- тела	BrCN-активированная сефароза 4В	825
[³ H]машозо-меченые олигосахариды из диплоидных фибробластов че- ловека	Фитогемагглютини́н <i>Lens culinaris</i>	Сефароза 4В	488
	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	821

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Полисахариды и гликопротеины	То же	Конканавалин А, полимеризованный глутаральдегидом	288
Протеогликаны из ахиллового сухо- жилия быка	» »	Конканавалин А—сефароза	26
Белки сыворотки крови	Коллаген	Сефароза 4В	447
11S глобулин соевых бобов	Лектин	То же	335
Гликопротеины синаптических плаз- менных мембран	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза 4В	636
	Фитогемагглютинин <i>Lens culinaris</i> или агглютинин зародышей пше- ницы	ВrCN-активированная сефароза 4В	461
Гликопротеины мембран синаптиче- ских везикул	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	1321
Гликопротеины вируса	Фитогемагглютинин <i>Lens culinaris</i>	Сефароза 4В	489
Гормоны			
Хорионный гонадотропин (человека)	Конканавалин А	Сефароза 6В	298
Эстрадиол	Антитела к эстрадиолу	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропил- амином, янтарным ангидридом и N-оксисулфинимидным эфиром	225
Фолликулостимулирующий гормон (человека)	Конканавалин А	Сефароза 6В	298
Высокомолекулярные формы адрено- кортикотропного гормона	То же	Конканавалин А—агароза (Sigma)	319
¹²⁵ I-Меченый лизинвазопрессин	Нейрофизины	Сефароза 4В	378
Инсулин	Фракция антиинсулиновых глобул- нов сыворотки крови	Сефароза 2В	12, 10
Пролонгированный тироидный стиму- лятор	4S-тироидные белки	Сефароза 4В	1087
Лютеинизирующий гормон (человека)	Конканавалин А	Сефароза 6В	298
— — (овцы)	Иммуноглобулиновая фракция анти- тел к гормону	Сефароза 4В	439
8-Лизинвазопрессин	Нейрофизины	То же	920, 921

5 Пролактин (из амниотической жидкости человека) — (обезьяны) для удаления гормона роста Сывороточный прогормон ангиотензина (субстрат ренина) α- и β-Субъединицы лютеинизирующего гормона человека	Антитела к гипофизарному пролактину человека Антитела к плацентарному лактогену человека Конканавалин А Антитела к α-субъединице хорионного гонадотропина человека и β-субъединице лютеинизирующего гормона человека	» » » » Коиканавалин А—сефароза Сефароза 4В	552 462 925 216, 217
<i>Ингибиторы</i> α_1-Антитрипсин (ингибитор протеиназы) — из плазмы крови α_1-Антитрипсин из сыворотки крови мышей для избирательного удаления альбумина — из сыворотки человека Авидин Основной трипсиновый ингибитор органов быка Двойной комплекс ингибитора Баумана — Бирка и химотрипсина Ингибиторы протеиназ широкой специфичности из улитки (<i>Helix pomatia</i>) Ингибитор каталазы из маиса Ингибиторы химотрипсина — — из соевых бобов, канавалин и <i>E. coli</i> — — из картофеля Ингибитор дезоксирибонуклеазы из неочищенного экстракта тимуса теленка	Конканавалин А То же 3-Карбокси-4-нитрофенол κ-цепи Антиальбуминовый (мышь) иммуноглобулин Антиальбуминовый глобулин Биотин Биоцитин (в-N-биотинил-L-лизин) Трипсин » » Каталаза Химотрипсин Дезоксирибонуклеаза	Конканавалин А—сефароза Сефароза 4В BrCN-активированная сефароза 4В Сефароза 4В То же Целлюлоза Сефароза 4В То же Сефароза Трипсин—КМ-целлюлоза BrCN-активированная сефароза Сефароза Химотрипсин, полимеризованный глутаральдегидом Сферон 300 Сефароза 4В	826 708 683 827 828 780 247, 85 617 1041 1201 1098 355 51 1207 713

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Ингибитор семенной плазмы человека	Трипсин	Сефазим трипсин	502
Ингибитор катепсина D из сока кар- тофели	Катепсин D	Сефароза 4B	628
— дезоксирибонуклеазы (тимуса те- ленка)	Дезоксирибонуклеаза	То же	714
— трипсина и химотрипсина из нута	Трипсин	Сефароза 6B	96
Модифицированный ингибитор трип- сина (состоящий из двух пептид- ных цепей, связанных дисульфид- ными мостиками) из манса	»	Нерастворимый полимер трипсина	512
Природные ингибиторы протеиназ	Трипсин, химотрипсин или калликре- ин	ЭМА	386, 387
	Протеиназы	ЭМА или ЭМА с гексаметилендиами- ном и диметилэтилендиамином	385
	Трипсин или плазмин	ЭМА или ЭМА с диметилэтиленди- амином	383
Овоингибитор (кур)	Химотрипсин	Сефароза 2B	354
Овомукоид	Трипсин	Сефадекс G 200	91
Ингибиторы трипсина из земляного ореха и соевых бобов	Трипсин или трипсиноген	Сефароза 4B-200	1121
α_2 -Ингибитор плазмина из плазмы крови человека	Плазминоген	Сефароза 4B	802
Полivalentные изоингибиторы трип- сина, химотрипсина, плазмина и калликреина из актиния	Трипсин	Целлюлоза	380
— — из улиток		Целлюлоза — трипсин (Merck)	1202
— — из бронхального секрета чело- века		Биогель	513
Ингибиторы протеиназ	»	Трипсин целлюлоза	384
— — из плазмы спермы человека		КМ-целлюлоза	362
— — из актиний			1298
— — из сыворотки крови кур			72
— — из культуры клеток <i>Scopolia</i> <i>japonica</i>		Сефароза 4B	998

- — из черного гороха
- Ингибитор рибонуклеазы из печени крысы
- Тропонин I (ингибиторный белок) из камбаловидной мышцы кролика
- Ингибитор трипсина (ингибитор Ку-питна)
- — из легких
- — из зародышей пшеницы и ржи
- — из земляного ореха (*Arachis hypogaea*) и из картофеля (*Solanum tuberosum*)
- — из соевых бобов, канавалин и *E. coli*
- — из молозива коровы
- — из фасоли
- — из мочи беременных женщин

Лектины

- N-Ацетил-D-глюкозаминспецифичный агглютинин пшеницы
- Агглютинирующий фактор из *Dictyostelium discoideum*
- Агглютинин
- Агглютинины
- из *Abrus precatorius* и *Ricinus communis*
- из канавалин, зародышей пшеницы и соевых бобов
- из лимы, сои, восковой фасоли и *Bandeiraea simplicifolia*
- из *Limulus polyphemus*
- из *Solanum tuberosum* (СТА — лектин)

Трипсин и химотрипсин
Рибонуклеаза

Тропонин С

Трипсин

Химотрипсин
Трипсин

»

2-Ацетамидо-N-(ε-амилокапроил)-
2-дезоксиг-β-D-глюкопиранозил-
амин

Агароза

Овомукоид
n-Аминофенилглюкозиды
Сшитая галактоза

Гликопротеины (пероксидаза и овомукоид) или производные стро-
мы

Конканавалин А

Эритроциты лошади

Овомукоид

Сефароза 6В
КМ-целлюлоза

Сефароза 4В

То же

Сферон 300
Нерастворимый полимерный трипсин

Трипсин, полимеризованный глутаральдегидом

Сефароза 4В

Сефароза 6В

То же

Сефароза 4В

То же

» »

Кизельгур

Сефароза 4В

То же

Аффинанты, полимеризованные глутаральдегидом

Конканавалин А—сефароза

Формалинизированные эритроциты лошади

Сефароза 4В

414

449

1145

190

1207

514

511, 515

51

179

1135

812

176

733

973

159

120

865

51

112

850

268

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Анти А-агглютинины из <i>Helix pomatia</i>	<i>n</i> -Аминобензил-1-тио- β -D-1,2-дидезокси- β -D-глюкопиранозид	То же	268
Анти-А-фитогемагглютинины из <i>Vicia cracca</i>	Декстран	Сефадекс G-200	570
	Групповое вещество А крови	Сефароза 2В с лизинном или аминок-этилцеллюлоза	657
Анти-В-гемагглютинины из <i>Streptomyces</i> sp.	Гуммиарабик	Сефароза 2В	1135
Анти-Н-гемагглютинины	Три-N-ацетилхитотриоза	Гуммиарабик, сшитый эпихлоргидрином	395
	»	Крахмал	768
		Три-N-ацетилхитотриоза и крахмал, сшитые эпихлоргидрином	769, 770
Анти Н-гемагглютинины из сыворотки крови угря	L-Фукоза	Крахмал	768
		L-Фукоза и крахмал, сшитые эпихлоргидрином	769, 770
Агглютинин аксианеллы	Агароза	Сефароза 6В	748
Группы крови А специфичный лектин из <i>Dolichos Biflorus</i>	Групповое вещество А крови	Групповое вещество крови, сополимеризованное с N-карбоксангидридом L-лейцина	340
Конканавалин А	Сшитый гель декстрана	Сефадекс G-50	8, 614
— из канавалии (<i>Canavalia ensiformis</i>)	То же	Сефадекс G-100	866
Фавин	Фетунин	Сефароза 4В	1043
L-Фукозосвязывающие белки (анти-Н-лектин) из семян <i>Lotus tetragonolobus</i>	N-(ϵ -Аминокапронил)- β -L фукопираниозиламин	То же	1043
D-Галактопиранозилсвязывающие лектины	»	» »	124
Галактозосвязывающий гемагглютинин	Гуаран (галактоманнан)	Сшитый гуаран	731
D-Галактозо- и N-ацетил-D-галактозаминсвязывающие лектины	Агароза	Сефароза 4В	423
	Агароза, обработанная кислотой	Сефароза 6В, обработанная кислотой	19

Галактозосвязывающие фитоагглютинины из <i>Ricinus communis</i> , <i>Momordia charantia</i> и <i>Abrus precatoris</i>	Полимер β -галактозильной структуры	Сефароза 4В	1179
α -D-Галактозилсвязывающий лектин Гемагглютинин из чечевицы (<i>Lens culinaris</i>)	Мелибионат калия Декстран	Аминоэтил-биогель Р-300 Сефадекс G-100	487 543
— из чечевицы		Сефадекс G-150	1175
— из гороха			326, 327
— из <i>Phaseolus vulgaris</i>	Тироглобулин	Сефароза 4В	768
— из <i>Limulus polyphemus</i>	Гликопротеин из секрета подчелюстной железы быка	BrCN-активированная сефароза 4В	875
— из <i>Lotus tetragonolobus</i>	(A + H)-групповые вещества крови свиньи	(A + H)-групповые вещества крови свиньи, сополимеризованные с N-карбоксангидридом L-лейцина	900
— из семян <i>Sophora japonica</i>	D-Галактоза	Сшитые D-галактозный гель сефарозы 6В	1162
— I из <i>Ulex europaeus</i>	A- и H-активный желудочный сок свиньи	A- и H-активный муцци, сополимеризованный с N-карбоксангидридом	917
Фактор X свертывания крови человека	α - и β -Аиомеры 6-амино-1-гексил-L-фукопиранозы	Сефароза 4В	390
Иодированный агглютинин зародышей пшеницы	Голубой декстран 2000	Биогель А-15	1226
	Овомукоид	Сефароза 4В	246
Лектины	Сахара	Различные	722
— фракции из семян <i>Ricinus communis</i>	п-Аминофенилгликозид	Сефароза 4В	120
— из <i>Caragana arborescens</i> (семена)	Агароза	То же	703
— из молчих калифорнийских белых бобов, красных бобов Айдахо и белой фасоли	2-Ацетамидо-О-(п-аминофенил)-2-дезоксиг- β -D-галактопиранозид	» »	122
	Фетуин	» »	1043

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— из <i>Ricinus communis</i> (семена)	Агароза	Сефароза 6В	544
— из <i>Vicia ervilia</i>	D-Манноза	Сефадекс G-150	368
— из <i>Vicia faba</i>	Декстран	Групповое вещество крови типа А, сополимеризованное с N карбоксангидридом L-лейцина	20
— из лимы	Групповое вещество крови типа А	Сефароза 4В	403
Гемагглютинин из <i>Limulus</i>	Фетuin	То же	1043
Гемагглютинин <i>Limulus polyphemus</i>	Секрет подчелюстной железы быка	Сефароза 4В с N,N'-диаминодипропиламином и янтарным ангидридом	967
Лектин <i>Maclura pomifera</i>	D-Галактозамин	Сшитый декстрановый гель	1210
Малселированный димер конканавалина	Декстран	Сефадекс G 75	1317
Митогены из корней лаконоса (<i>Phytolacca americana</i>)	Десенсилизированный гликопептид эритроцитов человека	Сефароза 4В	1309
Неспецифический фитогемагглютинин из <i>Vicia crassa</i>	Декстран	Сефадекс G-100	43
Фитогемагглютинины	Агароза, обработанная кислотой	Обработанная кислотой, сшитая эпихлоргидрином, десульфатированная сефароза 6В	334
	Алкенил-О-гликозиды	Алкенил-О-гликозиды, сополимеризованные с акриламидом и N,N'-метилденбисакриламидом	537
	D-Галактозиды, D-глюкозиды, D-маннозиды	Полиакриламидные гели	538
	Аллилгликозиды	Акриламид	539
— из семян <i>Bauhinia purpurea</i>	Сшитая D-галактоза	Сефароза 6В	567
— из семян <i>Maackia amurensis</i>	Гликопептиды свиного тироглобулина	Сефароза 4В	622
— из гороха и чечевицы	Декстран	Сефадекс G-200, G-100 или G-50	328
— из <i>Phaseolus vulgaris</i>	Тироглобулин	BrCN-активированная сефароза 4В	359
Протектин анти-А ₁ Н ₂ из белковой железы <i>Helix pomatia</i>	Декстран	Сефадекс G-200	663

Лектин печени кролика (связывающий белок, специфичный к асиалогликопротеинам)	Асиалоорозомукоид	Сефароза 4В	546
Агглютинин <i>Ricinus communis</i>	Агароза	Биогель А-0,5т	844
Гемагглютинин улитки	Желудочный сок свиньи с активностью групповых веществ крови А + Н	А + Н свиньи, сополимеризованные с N-карбоксангидридом L-лейцина	471
Агглютинин соевых бобов	N-ε-Аминокапроил-β-D-галактопираниозиламин	Сефароза 4В	434
Лектин соевых бобов	Галактозамин	СН-сефароза	18
Тридакний из гемолимфы <i>Tridacna maxima</i>	N-Ацетил-D-галактозамин	Эпоксифункционизированная сефароза 6В	1237
	Арабиногалактан	Арабиногалактан, сополимеризованный с N-карбоксангидридом L-лейцина, смешанным с сефарозой 4В	62
Агглютинин зародышей пшеницы	Овомукоид	Сефароза 4В	700
	Хитин (полимер N-ацетилглюкозамина)	Хитин	121
	Ацетида-N-(ε-аминокапроил)-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиламин	Сефароза 4В	721
	6-Амино-1-гексил-2-ацетида-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид	То же	1054
	То же	Полиакриламидный гель, сополимеризованный с активированными эфирами (N-сукцинимидилакрилатом и N-фталимидилакрилатом)	1024
	Фетунн	Сефароза 4В	1043
	Аспарагинил N-ацетилглюкозамина	Сшитая эпихлоргидрином десульфатированная сефароза 4В	1249
	N-Ацетил-D-глюкозамин	Эпоксифункционизированная сефароза 6В	1237
Липиды			
Холинэргический протеолипид из хвостатых ядер коровы	п-Фенилтриметиламмоний	Сефадекс LII-20 с 3,3'-иминобиспропиламино	1005
Липиды из плазмы крови	Додецилами	Сефароза 4В	273

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
<i>Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды</i>			
Аденозин, 5'-аденилат, полиаденилат и рРНК	5'-Тимидилат	Целлюлоза	1001
Аденозин-3':5'-монофосфат	Специфичные цикло-АМР-связывающие белки	Сефароза 2В	364
Полинуклеотиды, богатые аденозин-монофосфатом	Олигомеры полидезокситимидилата	Целлюлоза	312
Биологически активная глобиновая информационная РНК	Олиготимидиловая кислота	»	50
Биологически чистая информационная РНК из миеомы мыши	Антитела (метод двойных антител)	Сефароза 4В	1014
ДНК тимуса телят	Гистон КАР	То же	888
Кодирующая часть овальбуминового гена	иРНК овальбумина	Фосфоцеллюлоза	1296
Комплементарные последовательности ДНК	РНК	Целлюлоза	1060
Комплементарные последовательности РНК	ДНК	»	1060
Комплементарные части в препаратах ДНК, полученных из клеток, инфицированных одионитевым ДНК-содержащим бактериофагом ф X174	ДНК	»	790
Цитидин	Гуанозин	Амберлит CG 50/II с гидразидом кислоты	1205
Дезоксиаденозиновые нуклеотиды	Тимидинполинуклеотид	Целлюлоза	424
Дезоксицитидин	Аденозин или гуанозин	Амберлит CG 50/II с гидразидом кислоты	1205
Олигомеры дезокситимидиновой кислоты, полученные поликонденсацией	Олигомеры дезоксиадениловой кислоты, ковалентно связанные с поливинилловым спиртом	ДЭАЗ-целлюлоза	1027
ДНК (телят и человека)	Гистоны (телят и человека) Конканавалин А	Сефароза 4В То же	54 307

— определенных последовательно- стей	РНК	Целлюлоза	1059
— из <i>Escherichia coli</i>	РНК	Сэфароза 4В-200	956
— для удаления полисахаридных примесей	Конканавалин А	Гликозилекс А	308
Дуплексная ДНК, содержащая кла- стеры (dA·dT)	Полиуридиловая кислота	Поли(U)-сефадекс	365
Информационные рибонуклеиновые кислоты эукариот	Олигодезокситимидиловая кислота	Олиго(dT)-целлюлоза, тип Т-2	660
— — — (глобины кролика)	Полиуридиловая кислота	Целлюлоза	914
Фракции клеточной ДНК	Бензоилхлорид	ДЭАЭ-целлюлоза	905
— дрожжевых рибонуклеиновых кис- лот	Гуанин	Целлюлоза	596
Геноспецифичная информационная РНК	ДНК	Нитроцеллюлоза	84
Глобиновая информационная РНК	Олиготимидиловая кислота	Целлюлоза	1262
	Олигодезокситимидиловая кислота	Олиго(dT)-целлюлоза	419
	То же	Целлюлоза	429
	» »	»	364
Глобиновая информационная РНК человека			
Глобиновые информационные рибо- нуклеопротеиновые комплексы из диссоциированных пуромицином полирибосом утки и кролика	» »	Олиго(dT)-целлюлоза	406
Изоакцентирующие виды фенилал- аниновой тРНК, содержащих ос- нование У (сильно модифициро- ванное производное гуанозина)	Анти-У-антитела	BrCN-активированная сэфароза	999
Изолейцил-тРНК	Изолейцил-тРНК-синтетаза	Сэфароза 4В	270
Информационная РНК, кодирующая L-цепь иммуноглобулина мыши	Олиготимидин	Целлюлоза	1014
— — — тубулин и актин	Олигодезокситимидилат	Олиго(dT)-целлюлоза	441
— — — легкую цепь миеломы	Олиготимидилат	Целлюлоза	1139
— — — из полисом, содержащих поли- адепниловую кислоту, животных клеток и KB-клеток	Полнуридиловая кислота	Сэфароза 4В	717, 718

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
— — из фибробластов человека	Олигодезокситимидиловая кислота	Целлюлоза	901
— — из полисом	То же	»	896
— — из ткани хрусталика глаза	» »	»	219
крысы	» »	»	832
— — из полисом печени крысы	Аденозин	»	137
Микросомальная РНК	Меркури(II)ацетат	Сефадекс G-25 с 1-аллилокси-2,3-эпоксипропаном	453
Мононуклеотиды	3,6-Бис(ацетатомеркуриметил)дионсан	Сефадекс с 2-аминометилсульфатом и N-ацетилгомоцистеинтиолактоном	181
Неспиральные полинуклеотиды	Хромовый аналог актиномина C ₁ (D)	Сефароза 4B с гексаметилендиаминном	1040
Нуклеиновые кислоты	Олигодезоксирибонуклеотиды определенной структуры	Целлюлоза	45—47
Олигодезоксирибо- и олигорибонуклеотиды	Диоксиборильное производное	Диоксиборильзамещенный метакриловой кислоты полимер	1028, 1029
Олигонуклеотиды	Поливиниловый спирт с олигодезокситимидин-5'-фосфатом	ДЭАЭ-целлюлоза	1026
— и полинуклеотиды	Тритил- или нафтилкарбамоилпроизводные	Целлюлоза	379
Овальбуминовая информационная рибонуклеиновая кислота	Олигодезокситимидиловая кислота	»	946
Фаговые специфичные фрагменты ДНК	Дезоксиолиготимидин-5'-фосфат	ДЭАЭ-целлюлоза	1025
Фенилаланил- и лизил-рРНК	Полидесоксирибонуклеотиды или полирибонуклеотиды	Целлюлоза	331
Фенилаланиновая транспортная рибонуклеиновая кислота из дрожжей	Антитела к фенилаланиновой тРНК	ВгCN-активированная сефароза	392
Полнадениловая кислота	Короткие олигомеры политимидиловой кислоты	Целлюлоза	313
Полнадениловую кислоту содержащие РНК	Политимидилат	»	36
	Полнуридиловая кислота	»	1056

— — содержащая фракция РНК	Полидезонситимидиловая кислота	»	744
— — содержащая РНК из <i>Escherichia coli</i>	Олигодезокситимидиловая кислота	Олиго (dT)-целлюлоза	1107
Полиадениловая кислота в РНК из всей ядерной РНК	То же	Олиго(dT)-целлюлоза T2, T3	65
Полицитидиловая кислота	Полиинозиновая кислота	Ацетилированная фосфоцеллюлоза	6
Полиинозиновая кислота	Полицитидиловая кислота	То же	6
	Полиинозиновая кислота	» »	6
	Полирибодениловая кислота	» »	6
Полирибонуклеотиды из рибонуклеазного гидролизата рибонуклеиновой кислоты вируса мозаики костера	Тимидинполиинуклотид	Целлюлоза	425
Полирибодениловая кислота	Полицитидиловая кислота	Ацетилированная фосфоцеллюлоза	6
	Полиинозиновая кислота	То же	6
	Полирибодениловая кислота	» »	6
Полиуридиловая кислота	То же	» »	6
— — фрагмент из поли ^[32P] RF	Полиадениловая кислота	Сефароза	1307
Поли(U) (30—40 нуклеотидов), по следовательность из ядерных и цитоплазматических экстрактов клеток HeLa	То же	Метилденданилин-крахмал	1223
Пиримидинолигонуклеотиды	Метилальбумин	Кизельгур	634
Быстро меченная, связанная с полисомой рибонуклеиновая кислота	Политимидилат	Целлюлоза	831
Глобиновый информационный рибонуклеопротеин ретикулоцитов (мышь)	Олиготимидиловая кислота	»	162
Рибосомальная РНК	Рибосомальные белки	Сефароза 2В	465
	Рибосомальные белки из <i>Escherichia coli</i>	Сефароза 6В	1105
— — генов из <i>Bacillus subtilis</i>	РНК	Целлюлоза	1090
34S субъединицы рибонуклеиновой кислоты	Полиуридиловая кислота	Поли(U)-сефароза	557
РНК	Конканавалин А	Сефароза 4В	307
РНК- ДНК-гибриды	Полиинозиновая кислота	Сефадекс G-10	218
Растворимая рибонуклеиновая кислота	Бензоилхлорид	ДЭАЭ-целлюлоза	427

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Специфичная транспортная рибонуклеиновая кислота	»	»	426
— — — замещенная динитрофенильными группами	Антитела к динитрофенильным группам	Сефароза	393
SV-40 информационная РНК	SV-40 ДНК	Сефароза 4В	422
Тимидин	Аденозин или гуанозин	Амберлит CG 50/II с гидразидом кислот	1205
Тироглобулиновая информационная РНК	Полиуридиловая кислота	Сефароза 4В	1221
Транспортная РНК (дрожжевая)	Нуклеозидные производные	Целлюлоза	803
— — виды, содержащие инозин	Антиинозиновые антитела	Сефароза 4В	565
— — избирательно замещенная динитрофенильными группами	Антитела к динитрофенильным группам	BtCN-активированная сефароза	393
T ₄ -специфичная РНК	ДНК	Целлюлоза	83
Уридин	Гуанозин	Амберлит CG 50/II с гидразидом кислот	1205
Вирусная специфичная РНК из инфицированных клеток SV-40	Фрагменты ДНК SV-40	Целлюлоза	1058
Вителлогенин	Полиуридиловая кислота	Сефароза	1265, 598
Транспортная РНК желтого люпина	Гексаметилендиамин	Сефароза 4В	304
Связывающие и транспортные белки, рецепторы			
Ацетилхолиновый рецептор I	Метил-[(ε-аминокапроил)-ε-аминокапроил]-3-аминопиридилийбромид	То же	188
— — из денервированных гемидиафрагм крысы	[N-(ε-Аминокапроил)-п-аминобензонл]триметиламмонийбромид	» »	188
— — из электрической пластины нарциссы Калифорнийского залива	Кобратоксин	Сефароза, обработанная эпихлоргидрином и десульфатированная	144
	[N-(ε-Аминокапроил)-3-аминопропил]триметиламмонийбромид	Сефароза 2В	1021

Ацетилхолиновые рецепторы из <i>Torpedo californica</i>	[N-(ε-Аминокапроил) 3-аминопропил}триметиламмонийбромид ($0,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л)	То же	1022
— — из мышц млекопитающих	Триметил (4-аминофенил) аммоний-хлорид	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом, повторенными дважды	286
— — из мембраны мышцы	Эурабутоксин В	BrCN-активированная сефароза 4В	789
N-Ацетил D-глюкозаминсвязывающий белок	л-Аминобензил-1-тио-2-ацетамидо-2-дезокс-β-D-глюкопиранозид	Сефароза 4В с гексаметилендиамином и янтарным ангидридом	930
Адренэргический рецептор	L-Норэпинефринхлоргидрат	4%-ная агароза (сефароза или биогель) с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом	858
Альбумин из плазмы или сыворотки крови	Голубой декстран	Сефароза 4В	1186
— из сыворотки	Янтарный ангидрид или октил-, децил-, додецил-, октадецил-янтарный ангидрид	Сефароза 4В с диаминопропаном, диаминобутаном, диаминогексаном, диаминооктаном, диаминодеканом	42
Альдостеронсвязывающие макромолекулы	Дезоксикортикостеронгемисуцинат	Сефароза 4В с этилендиамином	739, 740
Аминокислотосвязывающие гликопротеины из <i>Neurospora crassa</i>	L-Аргинин	Сефадекс G-25	1126
Специфичные белки из мозга, связывающие конканавалин А	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	156
Цикло-АМР-рецепторные белки (субъединицы цикло-АМР-зависимой протеинкиназы и регуляторная цикло-АМР-рецепторная субъединица)	8-(6-Аминогексил)аминоаденозин-3',5'-монофосфат	BrCN-активированная сефароза	934
Карбоксилнесущий белок из <i>Escherichia coli</i>	Мономер авидина	Сефароза 4В	454
β-Адренэргический рецепторный белок сердца	Норэпинефрин	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом, повторенными дважды (30 А)	688
Холинэргический рецепторный белок из <i>Electrophorus electricus</i>	Четвертичная аммонийная соль	Сефароза 2В с гексаметилендиамином и N-ацетилгомоцистеинтиолактоном	863

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Холинэргический рецепторный белок (белки) из <i>Torpedo nobiliana</i>	Нейротоксин	Сефароза 4В	869
¹²⁵ С-Менсый рецептор лютеинизирующего гормона и хориальный гонадотропин человека	Хориальный гонадотропин человека	То же	886
Кобаламинсвязывающие белки из желудочного сока и сыворотки	Конъюгат оксокобаламинальбумин	Бромацетилцеллюлоза	861
— — (внутренний фактор и транскобаламин I)	Оксокобаламин	BrCN-активированная сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном	840
Кофермент А-связывающий белок	Восстановленная форма кофермента А	Сефароза 6В	776
Рецептор конканавалина А из L-клеток	Конканавалин А	Конканавалин А -- сефароза	548
α_1 -Кортикостероидсвязывающий глобулин из плазмы крови человека	Кортизон	Сефароза 4В	1185
Кортизонсвязывающий иммуноглобулин	Кортизонгемисукцинат	АН сефароза 4В	420
Цитокининсвязывающий белок из листьев табака	Кортизонсукцинилальбумин	BrCN-активированная сефароза 4В	421
Цитоплазматический глюкокортикоидсвязывающий белок (белки) из печени крысы	Бензилденин	То же	1150
ДНК-связывающие белки из <i>Escherichia coli</i>	Кортизонгемисукцинат	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном	1295
— — из неочищенных экстрактов клонов и вирустрасформированных субклонов фибробластов	Однонитевая ДНК	4% ная агароза (для электрофореза)	1011
— — из лимф. клеток человека, мыши и их гибридных клеток	ДНК	Целлюлоза	787
Рецепторы экидоина из тканей насекомых	ДНК	Агароза (Serva) или целлюлоза	599
	Инокостерок-С-26-карбоновая кислота	АИ-сефароза 4В	1104

Электролектин (β -D-галактозидсвязывающий белок из ткани электрического органа <i>Electrophorus electricus</i>)	Галактозилные остатки	Сефароза 6В с эпихлоргидрином после щелочного и кислотного гидролиза	1161
Рецепторы эстрадиола	3,17 β -Диоксистероид-1,3,5(10)-трис-7 α -ундекановая кислота	Сефароза 4В с аминодипропиламин	1199
— — из матки крысы	Денатурированная ДНК тимуса теленка	Целлюлоза	1301
— — из матки телки	Эстрадиол	Поливинил-(N-фениленмалеимид)	1231
— — из цитозоля матки телки	<i>n</i> -Аминобензилэстрадиол	<i>n</i> -Аминобензилцеллюлоза	1231
Фолатсвязывающий белок	17 β -Эстрадиол-17-гемисукцинат	Сефароза 4В с поли(L-лизил-DL-аланином)	1066
Гликопротеиновые рецепторы конканавалина А из мембран плазматических лимфоцитов свиньи	То же	То же	890
Рецепторы глюкогона из мембран клеток печени	Производное 7 α -эстрадиола	Сефароза	1198
Глюкокортикоидный рецептор из культуры клеток ткани гепатомы	Фолиевая кислота	Сефароза 6В с гексаметилендиамин	1000
— — из печени крысы	Конканавалин А	Сефароза 4В	17
Глюкозосвязывающий белок	Глюкагон	Сефароза 2В со связанным 3,3'-диаминодипропиламин	658
Рецепторы гонадотропина из тестикул самцов крыс	Производное дезоксикортикостерона	Биогель А-50м с гексаметилендиамин	343
Гемоглобин (человека)	ДНК	Целлюлоза	321
Гистидинсвязывающий белок J из <i>Salmonella typhimurium</i>	Флоретин	Биогель А-15м с 3,3'-диаминодипропиламин и <i>n</i> -нитробензоилазидом	346
¹³¹ I-Меченый сывороточный альбумин человека	Хориальный гонадотропин человека	Аффигель 10	297
	Гаптоглобин	Сефароза 4В	637
	Анилин или L-фенилаланин	То же	788
	Декаметилсиднами или додекаметилсиднами	> >	1050
	Алканы	> >	1048
	Антитела к сывороточному альбумину человека	Аминоцеллюлоза	404

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Иммуноглобулинсвязывающий фактор из аллоантигенаактивированных клеток тимуса	Иммуноглобулин G или M или F(ab') ₂ фрагмент иммуноглобулина G	BгCN-активированная сефароза 4В	457
Инсулиновый рецептор из мембран клеток печени	Инсулин	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламиносукцинил-N-оксисукцинимидным эфиром	240
	"	Агароза с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом	245
	Конканавалин А	Сефароза 4В	245
	Каприлилгидразид	То же	847
β-Лактоглобулин, овалбумин и бычий сывороточный альбумин	Пролонгированный тиронный стимулятор	» »	1087
Белок, связывающий пролонгированный тиронный стимулятор	Фолиевая кислота	BгCN-активированная сефароза 4В с гексаметилсндиамином	1252
Низкомолекулярный связывающий белок из молока человека	Асналоорозомуконд	Сефароза 4В	924
Мембранный рецепторный белок для асналогликопротеинов из печени кролика	L-Метионин	CН-сефароза	1118
Метионинсвязывающий белок из <i>Aspergillus nidulans</i>	8-Лизин-вазопрессин (после обратной защиты α-аминогруппы вазопрессина)	BгCN-активированная сефароза 4В	311
Метилированный и немодифицированный нейрофизины (быка)	8-Лизин-вазопрессин	Сефароза 4В	377
Нейрофизины	Нейротоксин	Спигтая эпихлоргидрином десульфатированная сефароза 4В	613
Никотин-ацетилхолиновый рецептор	17-β-Эстрадиол-17-гемисукцинат	Агароза с 3,3'-диаминодипропиламинном	1066
Рецепторы эстрадиола	ДНК	Целлюлоза	215
— — комплекс	6-Аминопеннилламовая кислота	Сефароза 4В с 3,3'-диаминопропиламинном и янтарным ангидридом	127, 128
Пенициллинсвязывающие компоненты из мембран <i>Bacillus subtilis</i>	Дезоксикортикостеронгемисукцинат	Сефароза 4В с бычьим сывороточным альбумином	662
Прогестеронсвязывающие компоненты яйцевода кур			

Прогестеронсвязывающий глобин	17-Гемисукцинат 19-нортестостерона	Сефароза 4В с 3,3'-диаминопропил-амином	196
Прогестерон-рецепторный комплекс	АТР	Сефароза 4В с дигидразидами адипиновой кислоты	816
Рецепторные белки для конканавалина А из мембран эритроцитов человека	Конканавалин А	Конканавалин А — сефароза 4В	361
Рецепторы агглютинации зародышей пшеницы и лектинов	Лектины	Сефароза 2В	5
Ретинолсвязывающий белок	Пресальбумин	Сефароза 4В	1217
РНК-связывающие белки	рРНК	ВгСN-активированная сефароза 4В	922
Белки, связывающие РНК-полимеразу	Полиуридиловая кислота	КМ-целлюлоза	923
Сывороточный альбумин	РНК-полимераза	Сефароза 4В	936
— — (человека)	Жирные кислоты	Сефароза 4В с этилендиамином	902
	Билирубин	АН-сефароза 4В	499
	Анилин или L-фенилаланин	Сефароза 4В	788
	Антитела к сывороточному альбумину человека	Тиолированные и сшитые антитела	1117
	То же	Аминоцеллюлоза	404
	» »	Связанные дисульфидными связями антитела с помощью N-ацетилглюкозистеннтиоляктона	237
Глобулин, связывающий половой гормон	Окислянтная кислота	Сефароза 4В с 1,4-диаминбутаном	1271
Растворимые связывающие белки из ядер и цитоплазмы клеток печени крысы	3-Гемисукцинат 5 α -андростан-3 α , 17 β -диола	Энзакрил АА	472
Специфичные ядерные рецепторы эстроген-рецепторных комплексов	Полиаденилат калия	ВгСN-активированная сефароза 4В	1034
Стероид-рецепторные комплексы	Ядерные фракции	Сефароза 4В	928
Тестостерон-эстрадиолсвязывающий глобулин из плазмы крови человека	Дезоксирибонуклеиновая кислота	Целлюлоза	750, 568
Тиаминсвязывающий белок из <i>Escherichia coli</i>	5 α -Андростан-3 β , 17 β -диол-3-гемисукцинат	Сефароза 4В с эпихлоргидрином и азодианилином	976
Тиоксинсвязывающий глобулин из сыворотки крови человека	Тиаминпирофосфат	Сефароза 6В с этилендиамином	771, 772
	L-Тиоксин	Сефароза 4В	898, 899, 646

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Тиротропиновый рецептор	Тиротропин	Сефароза 4В	1159
Транскортин человека	Кортикостерон, окисленный надioneй кислотой	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном	689
Эстрадиольный рецептор матки	Эстрадиол	ПАВ-целлюлоза	113
Витамин В ₁₂ -связывающие белки	Витамин В ₁₂ (производные монокарбоновой кислоты)	Сефароза с 3,3'-диаминодипропиламинном	21
Витамин В ₁₂ -связывающий белок гранулоцитов человека и трансобаламин II плазмы крови человека	Монокарбоновой кислоты производные витамина В ₁₂	Сефароза 4В с 3,3'-диаминодипропиламинном	22
Витамин В ₁₂ -связывающие белки молока и слюны человека	Витамин В ₁₂	Сефароза с 3,3'-диаминодипропиламинном	160
— — — из желудочного сока человека	Конканавалин А	Сефароза	1266
<i>Белки и пептиды, содержащие SH-группы</i>			
Цистеинсодержащие гистоны	n-Хлормеркурибензоат	Сефароза 4В с этилендиаминном	982
Меркаптальбумин	n-Меркурибензоат	То же	569
SH-содержащие ДНК-нуклеопротеины	Глутатион-2-пиридилдисульфид	Сефароза 2В	172
SH-белки	3,6-Бис(ацетатомеркуриметил)диоксан	Сефадекс G-25	586
— (бычий сывороточный альбумин, фибрин, β-лактоглобулин, овальбумин, бычий гемоглобин)	n-Меркурианилин	SH-сефадекс	323
SH-содержащие пептиды из инсулина	n-(Ацетоксимеркури)анилин	Сополимер малеинового ангидрида и этилена с n-меркурианилином в присутствии гексаметилендиамина	706
— — белки	5,5'-Дитиобис(2-нитробензоат)	Сополимер малеинового ангидрида и n-этилена	707
— — из парвальбумина, меркаптальбумина и церулоплазмينا	Глутатион-2-пиридилдисульфид	Сефароза 4В с 1,6-диаминогексаном	712
		Активированная тиол-сефароза 4В	318

Триптические пептиды, содержащие тиольные группы, существенные для ломбрициклиназной активности	л-Аминофенилмеркури(II)ацетат	Сефароза 4В	271
Другие белки			
А-белок из нормальной сыворотки крови акулы	Декстран или леван	Сефадекс G-75 или сшитый гель левана	474
ага С-белок (регуляторный белок, требуемый для проявления оперона L-арабинозы)	4-[4-(4-Аминофенил)бутанамидо]фенил-β-D-6-дезоксигалактопиранозид	Сефароза 4В	1288
	4-[4-(4-Аминофенил)бутанамидо]фенил-β-D-фукопиранозид	То же	1287
Бактериальный и фаговый белки	Гомополимер РНК	Целлюлоза ватман CF11	173
Гистоны тимуса теленка	Гистон H ₄	Сефароза 4В	800
Катионные белки из гранулоцитов нейтрофилов	4-Фенилбутиламин	BtCN-активированная сефароза 4В	952
С4 из псевдоглобулиновой фракции сыворотки крови человека	IgG человека	Сефароза 6В	895
Овофлавопротеин белка куриных яиц	3-Карбоксиметилрибофлазин-5'-фосфат	Сефароза 4В	119
Холинэргический протеолипид из мышцы ноги курицы	л-Фенилтриметиламмоний	Сефадекс L11-20 с 3,3-диминобиспропиламино	728
Фибриноген из плазмы крови	Фибриноген, активированный тромбином	Сефароза 6В	1113
Коагулянтный белок из яда гадюки Рассела	Фактор X свертывания крови	Сефароза 4В	399
Нерастворимый на холоду глобулин	Фибриноген	Сефароза 6В	1114
Цитоплазматический белок с высокой аффинностью к dРНК	РНК	Сефароза 2В	317
Различные миозины и фрагменты активного миозина	АТР, окисленный периодатом	Сефароза 4В с дигидразидом себаиновой кислоты (или 2В с адипиновым дигидразидом)	874
Солюбилизованные додецилсульфатом белки мембран эритроцитов человека	Янтарный ангидрид	Сефароза 4В с H ₂ N(CH ₂) ₁₀ NH ₂	1072

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Ферритин (опухоли)	Антитела (фракции IgG антисыворотки овцы к фракциям опухоли груди)	Сефароза 4В	763
α -Фетопротеины (человека, собаки и кролика)	Антитела к α -фетопротеину человека	Сефароза 6В	846
— (человека)	Специфические антитела к α -фетопротеину	Флороглюцинолуксипропил-сефароза 4В	175
— из сыворотки спинного мозга человека	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	882
— (человека, крысы и мыши)	γ -Глобулин	Сефароза 4В	212
Производные фибриногена	γ -Глобулиновая фракция из антисыворотки к α -фетопротеину человека	BgCN-активированная сефароза 4В	370
Тяжелый меромиозин	Эстрадиол-17 β -монометилсукцинат	Сефароза с диаминоэтаном	1213
Тяжелый меромиозин «двухголовый» и «одноголовый» S-1	Фибриноген или мономер фибрина	Сефароза 6В	491
Тяжелый меромиозин субфрагмент-1	АТР	Сефароза 2В с дигидразидом адипиновой кислоты	673
— — — обработанный тиоловыми реагентами	6-Аминогексанол-1-пирофосфат	Сефароза 4В	1191
Фракция гистона F3 из тимуса теленка	АТР	Сефароза 2В с дигидразидом адипиновой кислоты	675
Гистоны	АТР	Сефароза 2В	873
Липофильные белки	АТР	Сефароза 2В с дигидразидом адипиновой кислоты	676
Липопротеины из сыворотки крови свиньи	п-Хлормеркурибензоат	Сефароза 4В с этилендиамином	954
Меромиозин	п-Бутиламин, п-гексиламин или п-октилламин	Сефароза 4В	799
	1,10 Диаминодекан и янтарный ангидрид	Сефароза 6В	1310
	Конканавалин А	Сефароза 4В	55
	АТР	Сефароза 4В с гидразидом адипиновой или себаценовой кислоты	1284

Молекулярные варианты α_1 -фетопро- теина	Колканавалин А	Гликозилекс-А или конканавалин А—сефароза	1089
MORC 315, IgA блок миеломы (мы- ши), который связывает нитрофе- нильные лиганды	ϵ -N-ДНФ-лизин	Сефароза 4В	433
Миозин (кур)	АТР	Сефароза 2В с дигидразином себацй- новой кислоты	675
— из скелетных мышц кролика	N ⁶ -(6-Аминогексил)-ADP	Сефароза 4В	1191
— из небольших количества мышечной и немышечной ткани	8-(6-Аминогексил)амино-ADP или N ⁶ -(6-аминогексил)-ADP	То же	1190
Никотиновый и мускариновый гидро- фобные белки	Четвертичное аммониевое соединение, п-фенилтриметиламмоний, прояв- ляющее холинэргический харак- тер	Сефадекс LH-20 с 3,3'-диаминоди- пропиламино	71
«Одноголовый» тринитрофенилирован- ный миозин и тяжелый меромио- зин	Дигидразид себацйновой или адипи- новой кислоты с АТР	Сефароза	401
Папаиновый гидролизат миозина	8-(6-Аминогексил)амино-ADP	Сефароза 4В	1191
P-450 гемопротеины из <i>Rhizobium</i> <i>japonicum</i>	м-Аминофенобарбитал	То же	303
Фосфорилированные ядерные неги- стонные белки	ДНК	Целлюлоза	88
Хроматин растений	РНК-полимераза	Аффигель 10	577
Пластиночный микротубульный бе- лок	γ -Глобулиновая фракция антитубули- новой сыворотки	То же	559
Предшественник белка (P23) голов- ки бактериофага T ₄	Антитела к P23	BrCN-активированная сефароза 4В	1303
Белковый фактор, стимулирующий ДНК-зависимый синтез РНК из побегов гороха и кукурузы	2,4-Дихлорфеноксиацетил- ϵ -L-лизин	Сефароза 4В	1222
Белковые фракции из постробосо- мальных супернатантов ретику- лоцитов кролика и печени крысы	Полиадениловая кислота	То же	398
Белки из бесклеточных экстрактов <i>Escherichia coli</i>	L-Валин	» »	951
— ядерных 30S частиц печени крысы	Полиуридилат	Поли(U)-сефароза 4В	1035
Виды белка, выделенные из цито- плазмы клеток HeLa	Полиаденилат	Сефароза 4В	118

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
Ретикулоцитов ^[3H] негистонный белок	ДНК эритроцитов	Целлюлоза	402
Рибосомальные белки	РНК	Сефароза 4В с дигидразидом адипиновой кислоты	163
Устойчивая к РНКазе рибонуклеопротеиновая фракция из полирибосом HeLa	Полиуридиловая кислота	BгCN-активированная сефароза 4В	633
Серотипичный специфический глобулин	Бактериальные клетки	ДЭАЭ-целлюлоза	782
Коллагены мягких тканей	2,2'-Дипиридилдисульфид	Тиоактивированная сефароза 4В	1144
Специфический белок, связывающий л-аминобензоат	л-Аминобензоилхлорид	Целлюлоза	1184
Тропомозин и тропонин	F-актин	Сефароза 4В	643
Белок-коагулянт из яда <i>Vipera russelli</i>	Фактор X, уравновешенный ионами лантанидов	Сефароза	400
<i>Специфические пептиды и аминокислоты</i>			
Аффинно-меченые пептиды из трипсинового гидролизата стафилококковой нуклеазы	Нуклеаза	Сефароза 4В	1277
Арсанилазотирозилсодержащие пептиды	Антитела к азобензоларсонату	То же	1280
Биотинсодержащие пептиды	Авидин	» »	130
Цистенин- и метионинсодержащие пептиды (после реакции с Na-бром-ацетил-Nε-ДНФ-L-лизинном)	Антитела к ДНФ-группе	» »	1279
Продукты деградации фибриногена человека	Фибриноген или мономер фибрина	Сефароза 6В	774
Динитрофенил-(ДНФ)-меченые пептиды из антител к ДНФ	Антитела к ДНФ-группе	Сефароза 4В	431
ДНФ-меченые пептиды из чистого гидролизата тяжелых цепей	То же	То же	430
ДНФ-лизилсодержащий пептид	» »	» »	1280

Фрагмент D вместе с высокомолекулярным материалом из плазминового гидролизата фибриногена	Фибриноген	БГ-Л-активированная сефароза 4Б	221
Фрагменты папаинового гидролизата иммуноглобулина G человека	Антитела	Биогель Р-300	1004
Гликопептиды	Гликопептиды, полученные при протеолитическом гидролизе различных гликопротеинов	Сефароза 2В или 4В	1044
	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	856
	То же	Гликозидекс А	1178
	» »	Конканавалин А—сефароза	659
Гликопептиды (нейтральные), полученные из гликопротеинов мозга крысы			
Гем-пептиды цитохрома с	Сывороточный альбумин (быка или человека)	Сефароза 4В	1278, 1279
Полипептидные цепи иммуноглобулина	Антитела	То же	756
Иммунологически активные и структурно подобные фрагменты трипсинового гидролизата белка А	Иммуноглобулин G	» »	507
D- и L-Изомеры β-3,4-диоксифенилаланина (ДОФА)	L-Аргинин	Сефадекс G-25 с цианурхлоридом	59
NH ₂ -Концевой активационный пептид из плазминогена	Плазминоген В	Сефароза 4В	1290
Производные нуклеазы (смесь фрагментов нуклеазы)	3-(4-Аминофенилфосфорил) дезокситимидин-5'-фосфат	То же	32
Нитротирозинсодержащие пептиды	Антитела к нитротирозину	Сефароза	494
— — из химотрипсинового гидролизата карбоксипептидазы В	То же	»	1094
Пептиды, содержащие тирозин, меченные m-нитрофенилдиазониевым реагентом	Антитела к ДНФ-группе	Сефароза 4В	371
— — модифицированный тирозин	То же	То же	165
Пептид из связывающего участка антинитрофенильных антител	» »	» »	372
Плазматический фрагмент D	Фибриноген, обработанный тромбином	» »	661

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
S-Пептид рибонуклеазы, синтезированный твердофазным методом	S-Белок рибонуклеазы	» »	33
Синтетические фрагменты рибонуклеазы	Нативный фрагмент рибонуклеазы	Сефароза	182
Синтетический пептидный аналог фрагмента P ₂ стафилококковой нуклеазы	Фрагмент P ₂ (остатки 49—149)	Сефароза 4В	872
Синтетическое производное S-пептида рибонуклеазы	S-Белок рибонуклеазы	То же	618
D- и L-триптофан	Бычий сывороточный альбумин	Сефароза 4В-200 с этилендиамином и янтарным ангидридом	1122
Триптофансодержащие пептиды	Дезоксиолиготимидиловая кислота	ДЭАЗ-целлюлоза	306
— — после модификации 2,4-динитрофенилсульфенилхлоридом	Антитела к ДНФ-группам	Сефароза 4В	1285
	Монохлористая сера	Аминоэтилированный полиакриламид с ди-N-оксисукцинимидным эфиром 5,5'-дигиобис-2-нитробензойной кислотой	980
Тирозинсодержащие пептиды (после нитрования и арсанилирования)	Антитела к нитротирозину или арсенилазотирозину	Сефароза 4В	1279
Уридиндифосфат-меченый пептид из бычьей панкреатической рибонуклеазы	РНКаза	То же	431
Вирусы			
Вирус алеутской болезни норки	Антитела против алеутской болезни (найденные во фракции иммуноглобулинов G)	» »	630
	Иммуноглобулин из хронически инфицированного молока	» »	1313
Вирус ящура	Антитела против ящура	» »	767

Вирусы гриппа	γ-Глобулин кроликов, иммунизированных вирусом гриппа	Дисульфидносвязанный γ-глобулин с помощью N-ацетилгомоцистеин-тиолактона	1143
Белок — предшественник вируса р30 мышинного типа С	Однонитевая ДНК	Целлюлоза	877
Вирус растений	Антитела	Антитела, сшитые глутаральдегидом	671
Вирус табачной мозаики	Антитела к вирусу табачной мозаики	п-Аминобензилцеллюлоза	405
Актив из скелетных мышц кролика	Дезоксирибонуклеаза I	Биогель А-15	684
Фактор агглютинация	Полимер D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы	Сефароза 4В	973
Ароматический комплекс из <i>Neurospora crassa</i>	Фосфат	Фосфоцеллюлоза	220
Билирубин и другие связываемые альбумином вещества из плазмы и крови	Сывороточный альбумин человека	Биогель А-5m	909
Тканевый фактор коагулирующей активности из мозга быка	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	907
Токсин холеры из <i>Vibrio cholerae</i>	Ганглиозиды	Агароза с 3,3'-диаминодипропиламинном или альбумином	889
Фактор коагуляции	Гепарин	Агароза (Bio-Rad 0,5)	415
Дифтерийный токсин	Никотинамидадениндинуклеотид	Сефароза 4В со связанной ε-аминокапроновой кислотой	250
Энтеротоксин из <i>Vibrio cholerae</i>	Ганглиозид	Сефароза 4В со связанным нативным альбумином	241
Фактор 4 из тромбоцитов человека	Гепарин	Сефароза с ε-аминокапроновой кислотой	702
Фактор VII из плазмы крови быка	п-Аминобензамидин	Сефароза 4В с 1,5-диаминопентапом и янтарным ангидридом	595
Фактор IX из плазмы крови человека	Гепарин	Сефароза 4В	974
Первый компонент (C1) комплемента человека	γ-Глобулин человека	Сефароза 6В	115
	IgG иммуноглобулин	То же	116
	м-(м-Аминофенокснбутокси)бензамидин	Биогель А-5m	116
gal-Репрессор	п-Аминофенил-β-D-тио-галактозид	Сефароза с 3,3'-диаминодипропиламинном и янтарным ангидридом	892
Гиббереллины	Специфические антитела к гиббереллиновой кислоте	Сефароза 4В	394

Выделяемые вещества	Аффинные лиганды	Нерастворимые носители или иммобилизованные аффинные лиганды	Литература
α -Глюкозилированная тейхоевая кислота	Конканавалин А	То же	289
Группа А менингококковых поверхностных компонентов (водная фаза)	4-Фенилбутиламин	Сефароза	199
Виды гепарина с высокой и низкой активностями	Антитромбин	Сефароза 4В	535
Фактор хозяина, необходимый для репликации РНК РНК-фага Q β	Полиадениловая кислота	Целлюлоза	174
Человеческий хорионный сомато-матропин (ЧХС)	Антитела к ЧХС	Сефароза 4В	1261
Человеческая гломерулярная соединительнотканная мембрана	Антимембранный γ -G-глобулин	BtCN-активированная сефароза 4В	747
Иммунологически активная фракция карциноэмбрионного антигена	Конканавалин А	Сефароза 4В	968
Интерферон (человека)	Сывороточный альбумин	То же	545
— из лейкоцитов человека и клеток преопуцальных фибробластов	Антитела к интерферону лейкоцитов	» »	34
— (человека)	Глобулины из кроликов, иммунизированных этими интерферонами	» »	102
— из фибробластов человека	Конканавалин А	Конканавалин А—сефароза	256
	То же	То же	258
— из лейкоцитов человека	L- или D-триптофан, L-фенилаланин, L-тирозин	Агароза — L-триптофан и аналоги (Miles)	1128
— (мыши)	L-Триптофил-L-триптофан или L-триптофил-L-тирозин	Аффигель 10	1128
	Антиинтерферонный иммуноглобулин	Биогель А-15m	1074
— из перитонеальных клеток мыши	То же	BtCN-активированная сефароза 4В	857
— из L-клеток мыши	» »	Сефароза 4В	726
	» »	BtCN-активированная сефароза 4В	468
	Бычий сывороточный альбумин, ϵ -аминокапроновая кислота и лектин <i>Bandeiraea simplicifolia</i>	BtCN-активированная сефароза 4В или CN-сефароза 4В	257

Внутренний фактор (человека)	Оксокобаламин—альбумин	Целлюлоза	209
— — (человека и свиньи) и внут- ренний фактор (свиньи)	Витамин В ₁₂	3,3'-Диаминодипропиламинзамещен- ная сефароза	23
— — (свиньи)	Витамин В ₁₂ (производные монокар- боновой кислоты)	Сефароза с 3,3'-диаминодипропил- амином	21
Связанные с мембраной центры свя- зывания наркотиков	Кобаламин	Сефароза с бромэтиламином	705
Пропердин из сыворотки крови чело- века	Лавопранол или эторфин	Стекло	1073
	Антитела к пропердину человека	BrCN-активированная сефароза 4В	798, 797
	IgG фракция антисыворотки к сыво- ротке крови человека или к про- пердину	Сефароза 4В	644
Факторы инициации ретикулоцитов кролика	Гепарин	BrCN-активированная сефароза 4В	1240
Секреторный компонент крысы в сво- бодной форме	Фракция иммуноглобулинов G к сек- реторному иммуноглобулину A	Сефароза 4В	1216
РНК-содержащие препараты австра- лийского антигена	Иммуноглобулиновая фракция сыво- ротки, содержащей антитела к австралийскому антигену	То же	602
Субъединица C1q первого компонен- та комплемента человека	Человеческий IgG	Сефароза	1082
тРНК цистроны из <i>Escherichia coli</i>	Антитела к ДНФ-группе	Агароза биогель А-150	796
Трp репрессор из <i>Escherichia coli</i>	Ф80 рI ED ДНК	Целлюлоза	1062
Тубулин	Колхицин	Сефароза 4В с этилендиамином и п-нитробензонлазидом	1023
— из мозга	Смесь деацетилколхицина и изодеаце- тилколхицина	Сефароза 4В	501
— без протенкиназной активности	1) Производные колхицина; 2) Казенин	То же	1002

Фирменные названия носителей и иммобилизованных аффинных лигандов, упоминаемых в табл. 11.1

Название	Природа	Фирма
Активированная CN-сефароза 4B	CN-сефароза 4B, этерифицированная N-оксисукцинимидом	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция
Тнол-активированная сефароза 4B	2,2'-Дипиридилдисульфид и глутатион присоединены к BrCN-активированной сефарозе 4B	То же
2',5'-ADP-сефароза 4B	N ⁶ -(6-Аминогексил)аденозин-2',5'-бифосфат, ковалентно связанный с сефарозой 4B бромциановым методом	» »
AF 201	HOOC-(CH ₂) ₂ -CO-NH (CH ₂) ₂ -NH-агароза	Affitron Corp., США
Аффигель 10, 101, 102, 201, 202, 401, 501	См. табл. 8.3	Bio-Rad Labs., США
Аффиноза 202	То же, что и аффигель 202	То же
ε-Аминокапронилфукозамин-агароза (AF 5, 7, 10 и 11)	Фукозамин, ковалентно связанный с ε-аминокапронилагарозой	Miles-Jeda, Израиль
APUP-агароза	5'-(4-Аминофенил)уридин-2',3'-фосфат, присоединенный к агарозе	Miles Labs., США
Агароза—Gly—Gly—Tyr(OBzl)-Arg	Глицилглицил-О-бензил-L-тирозил-L-аргинин присоединен к агарозе бромциановым методом	То же
Поли(1)·поли(С)-гексан—агароза	Полирибоннозиновая и полирибоцитидиловая кислоты, связанные с агарозой (см. табл. 6.5)	P. L. Biochemicals, США
NADP-агароза	NADP, присоединенный к агарозе с помощью дигидразида адипиновой кислоты	То же
AG-NAD, тип 1	NAD ⁺ , присоединенный к агарозе с помощью капроновой кислоты	» »
АН-сефароза 4B	1,6-Диаминогексан, ковалентно связанный с сефарозой 4B	Farmacia Fine Chemicals, Швеция
Алкиламин CPG	Алкиламинное производное стекла	Pierce Chemical Co., США
Амберлит CG 50/II (амберлит IRC-50)	Слабокислотный полиметакрилатный ионообменник	Rohm & Haas, США

Б'-АМР—сефароза 4В	№6-(6-Аминогексил)-5'-АМР, присоединенный к сефарозе 4В бромциановым методом	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция
Биогель А-0,5m; А-1,5m; А-5m; А-50m	Агарозные гели с молекулярномассовыми пределами исключения $0,5 \cdot 10^6$; $1,5 \cdot 10^6$; $5 \cdot 10^6$ и $50 \cdot 10^6$	Bio-Rad Labs., США
Биогель Р-2, Р-150, Р-200, Р-300	Полнакриламидные гели с молекулярномассовыми пределами исключения $2 \cdot 10^5$; $150 \cdot 10^3$; $200 \cdot 10^3$ и $300 \cdot 10^3$	То же
Голубая сефароза	Цибакрон голубой F 3G-A, ковалентно связаный с сефарозой CL-6В триазинным методом	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция
СН-сефароза 4В	ε-Аминокапроновая кислота, ковалентно связанная с сефарозой 4В	То же
ВгСN-активированная сефароза 4В	Сефароза 4В, активированная бромцианом	» »
Соп А—агароза	Конканавалин А, присоединенный к агарозе	Sigma Chemical Co., США
Соп А—сефароза	Конканавалин А, ковалентно связанный с сефарозой 4В	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция
Купрофан	Целлюлозная мембрана	Enka Glanzstoff, ФРГ
Дегалан, V 26	Полиметилметакрилатные гранулы со средним диаметром 250 мкм	Degussa Wolfgang, ФРГ
ЭМА	Сополимер этилена и малеинового ангидрида	Monsanto Co., США
Эпоксинактивированная сефароза 6В	Сефароза 6В с 1,4-бис-2,3-эпоксипропоксипропаном	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция
Энкарил АА	Полнакриламидные гели, содержащие остатки аминокислот	Koch-Light, Англия
Гликозилекс А	Конканавалин А, связанный с агарозой	Miles Labs., США, и Slough, Англия
Индубиоза А4; АСА-3/4	Агароза	Industrie Française Biologique, Франция
Нерастворимая смола на основе трип-сина	Трипсин, ковалентно связанный с ЭМА	Merck, ФРГ
Олиго(dT)-целлюлоза Т2, Т3	Целлюлоза, содержащая ковалентно связанную олигодезокситимидиловую кислоту (10—12 оснований)	Collaborative Research, США
Поли-(U)-сефароза 4В	Полнуридиловая кислота, ковалентно связанная с сефарозой 4В бромциановым методом	Pharmacia Fine Chemicals, Швеция

Название	Природа	Фирма
Сефадекс G-25, G-50, G-75, G-100, G-150, G-200	Декстран, сшитый эпихлоргидрином, с молекулярно-массовыми пределами исключения $5 \cdot 10^3$; $10 \cdot 10^3$; $50 \cdot 10^3$; $100 \cdot 10^3$; $150 \cdot 10^3$ и $200 \cdot 10^3$	То же
Сефадекс LH-20	Оксипропил-сефадекс G-25	» »
Сефароза 2B, 4B, 6B	2, 4 и 6%-ная агароза	» »
Сефароза CL	Сефароза, сшитая 2,3-дибромпропанолом и де-сульфатированная щелочным гидролизом в восстановительных условиях	» »
Сефазимтрипсин	Трипсин, ковалентно связанный с сефарозой	» »
Soybean-КМ-целлюлоза, аффинный сорбент	Ингибитор трипсина из соевых бобов, ковалентно связанный с КМ-целлюлозой	Seravac Labs., Англия
Сферон-300	Оксиалкилметакрилатные гели с молекулярно-массовым пределом исключения 300 000	Lachema, СССР; Realco Chem. Co., США
Ультрагель (AcA22, AcA34, AcA44)	Полиакриламид-агароза гранулированная	LKB, Франция

11.1. ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Специфические сорбенты, использующие исключительные свойства биологически активных веществ образовывать специфические и обратимые комплексы, в огромной степени облегчают выделение ряда ферментов, их ингибиторов и кофакторов, антител и антигенов, лектинов, гликопротеинов, гликополисахаридов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, жиров, транспортных и рецепторных белков, гормонов и их рецепторов, клеток и многих других соединений, как это представлено в обзорной табл. 11.1. Наряду с названием выделяемого вещества в таблице приведены также используемые аффинные лиганды, нерастворимые носители и пространственные группы, причем указано, аффинный лиганд или нерастворимая матрица модифицированы данной пространственной группой. Обзорная таблица включает выделения веществ как с помощью типичной биоаффинной хроматографии, так и с помощью гидрофобной или ковалентной хроматографии.

Разнообразие условий выделения обусловлено природой выделяемых веществ. Хотя иногда вещество в гомогенном виде выделялось из сырого материала с помощью только хроматографии, значительно чаще встречаются случаи, когда для очистки необходима комбинация аффинной хроматографии с другими методами. Принципы, обязательные для успешной очистки и выделения вещества, в общем виде детально рассмотрены в гл. 5 и 10, и, опираясь на них, следует подбирать условия выделения для каждого конкретного случая. Для того чтобы читателя информировать об индивидуальных аффинных лигандах, которые были использованы, или о промышленно выпускаемых иммобилизованных аффинных лигандах, во всех случаях приведены коммерческие названия, если они были опубликованы. Эти иммобилизованные лиганды приведены в табл. 11.2, где указаны также их химическая природа и фирма-изготовитель.

11.2. РАЗДЕЛЕНИЕ D, L-ТРИПТОФАНА АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА КОЛОНКЕ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ НА АГАРОЗЕ БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Найдено, что некоторые оптические изомеры по-разному связываются сывороточными белками. Так, наблюдается различное связывание D- и L-изомеров D,L-триптофана бычьим сывороточным альбумином [783] и D,L-альдостерона кортикостероидсвязывающим глобулином [1220]. Стюарт и Догерти [1122] применили аффинную хроматографию для разделения D,L-триптофана с помощью бычьего сывороточного альбумина на агарозе.

Колончатая хроматография с использованием иммобилизованного бычьего сывороточного альбумина, присоединенного непосредственно к сефарозе 4В, сывороточного альбумина, присоединенного к сукцинилиминоэтилагарозе, или обезжиренного сывороточного альбумина (по методу Чена [195]), присоединенного также к

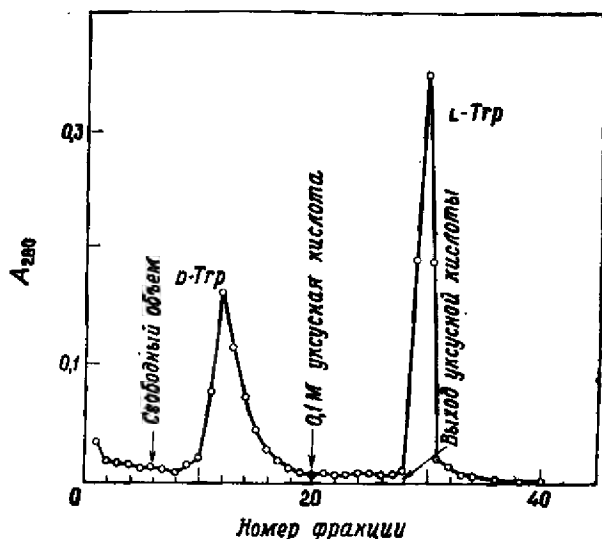


Рис. 11.1. Хроматография D,L-триптофана на препарате обезжиренный бычий сывороточный альбумин—сукцинилиминоэтилагароза (250×9 мм) [1122].

D,L-Триптофан (500 нмоль), растворенный в 0,1 мл 0,1 М боратного буфера (pH 9,2), содержащего 1 об. % диметилсульфоксида, наносился на колонку (содержащую 630 нмоль бычьего сывороточного альбумина). Колонка элюировалась со скоростью 30 мл/ч боратным буфером (без диметилсульфоксида) (пробы отбирались в 20 пробирок), а затем 0,1 М уксусной кислотой. Свободный объем был определен по элюированию диметилсульфоксида.

сукцинилиминоэтилагарозе, привела к наилучшим результатам только в последнем случае. Ход хроматографического разделения иллюстрирует рис. 11.1. Показано, что боратным буфером элюируется только D-триптофан, в то время как уксусной кислотой только L-триптофан. Аффинная хроматография, по-видимому, может быть применена для аналогичного разделения и других энантиомерных пар.

11.3. ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКАЯ НУКЛЕАЗА И КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ

Стафилококковая нуклеаза — фермент, исследованный с помощью аффинной хроматографии наиболее широко. Успешное выделение нуклеазы на сефарозе с присоединенным 3-(4-аминофе-

нилфосфорил) дезокситимидин-5'-фосфатом (pdTp-сефарозе) описано еще в 1968 г. [248]. Используя хроматографию триптического гидролизата нуклеазы, меченной (дезокситимидин-3',5'-дифосфатаминофенил) дезокситимидин-3-[^{14}C]бромацетил-*n*-аминофенилфосфатом на сефарозе с присоединенной нуклеазой, Вилчек [1277] получил пептиды активного центра фермента.

Проведя триптический гидролиз нуклеазы в присутствии Ca^{2+} и нуклеозид-3',5'-дезокситимидиндифосфата (pdTp), Онтъес и Ан-

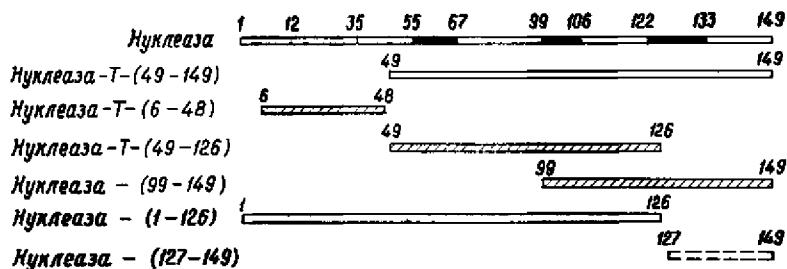


Рис. 11.2. Диаграмма линейной зависимости между аминокислотными последовательностями нуклеазы и ее фрагментами, которые дают продуктивную комплементарность. Рентгеноструктурными исследованиями были показаны β -структура между остатками 12 и 35 и три α -спиральных участка между остатками 55 и 67, 99 и 106, а также 122 и 133, которые отмечены на рисунке. Нуклеаза-(127-149) не связывается с нуклеазой-(1-126) [32].

финсен [871, 872] получили три фрагмента: пентапептид и два полипептидных фрагмента — нуклеаза-T-(6—48) и нуклеаза-T-(49—149) (рис. 11.2). Последние (оба фрагмента) были неактивными и не имели упорядоченной структуры, будучи взятыми в отдельности, но они обратимо ассоциировали с образованием нековалентно связанного комплекса, названного нуклеазой-T'. Нуклеаза-T' обладает 8% (1620 ед./мкмоль) активности нативного фермента (15800 ед./мкмоль), и ее трехмерная структура близка структуре нуклеазы. Такие же результаты были получены даже при замене нативного фрагмента нуклеаза-T-(6—48) аналогичным пептидом, синтезированным по методу Меррифила. Аффинная хроматография вновь оказалась весьма полезной и для очистки этого синтетического 42-членного пептида. Синтетический продукт очищался на сефарозе с присоединенным фрагментом нуклеаза-T-(49—149). Прежде всего предварительно небольшие количества нативного фрагмента нуклеаза-T-(6—48) хроматографировались на этой же колонке. Сорбция происходила при pH 8 в присутствии хлорида кальция и pdTp (необходимых для стабилизации комплекса). Нативный фрагмент затем элюировался разбавленной уксусной кислотой (pH 3), т. е. в условиях, когда комплекс диссоциирует. Согласно предва-

рительным результатам, предложена следующая методика очистки синтетического фрагмента. На колонку (5×1 см) наносили 5 мг синтетического пептида в 0,05 М боратном буфере (pH 8), содержащем 0,01 моль/л хлорида кальция и 0,001 моль/л рdTr. При промывании исходным буфером элюировалось некоторое количество пептида, имеющего состав и подвижность при диск-электрофореze нативного пептида-(6—48). Однако этот элюируемый пептид не сорбировался на колонке даже при повторной хроматографии. Около 7% общего количества нанесенного синтетического пептида элюировалось 0,001 М уксусной кислотой (pH 3). Эта часть не отличалась существенно по своему аминокислотному составу от исходного материала. Пептидный фрагмент, содержащийся в элюате, затем использовался для комплементарного комплексообразования с фрагментами нуклеазы-Т-(49—149) для полной замены нативного пептида. Таким образом была получена полусинтетическая нуклеаза.

Еще одним примером продуктивного комплементарного комплексообразования является комплекс двух других фрагментов той же нуклеазы, а именно комплекс, образованный нуклеазой-(1—126), приготовленной ограниченным триптическим гидролизом трифторацетилированной нуклеазы, и бромциановым фрагментом нуклеазы-(99—149). Этот комплекс обладает 10—12% ферментативной активности нативной нуклеазы [1154]. Оба упомянутые комплексы связывались с рdTr-сефарозой.

На рdTr-сефарозе была связана смесь трех фрагментов: 0,085 мкмоль нуклеазы-Т-(6—48), 0,060 мкмоль нуклеазы-Т-(49, 50—126) [нуклеаза-Т-(49, 50—126) представляет собой смесь пептидов—нуклеазы-Т-(49—126) и нуклеазы-Т-(50—126)], 0,067 мкмоль нуклеазы-(99—149) в присутствии 0,01 моль/л хлорида кальция в 0,2 мл 0,1 М ацетата аммония (pH 8) при 4, 10, 15 и 20 °С наносились на колонку (4×1 см) с рdTr-сефарозой [32]. Количество комплекса, элюируемого 0,1 М уксусной кислотой, сильно зависит от температуры; оно максимально при 4 °С и снижается с повышением температуры (см. рис. 10.1). На основании аминокислотного анализа и двумерных пептидных карт триптического гидролизата показано, что элюируемый комплекс состоит из эквимольных количеств нуклеазы-Т-(6—48), нуклеазы-Т-(49, 50—126) и нуклеазы-(99—149). Удельная активность комплекса 15,3 ед./мкмоль. Уменьшение сорбции комплекса, наблюдаемое при росте температуры, может объясняться ухудшением комплексообразования или снижением сродства аффинного лиганда к комплексу, которое обусловлено термической неустойчивостью ферментативной активности трехфрагментного комплекса. При аффинной хроматографии любой комбинации двух из трех упомянутых выше фрагментов не происходит существенной сорбции даже при 4 °С. При этой температуре не наблюдалась также сорбция трех фраг-

ментов в отсутствие хлорида кальция или при нанесении смеси фрагментов нуклеазы-(1—120) и нуклеазы-(127—149).

Эти результаты показывают, что аффинная хроматография может стать также важным методом изучения комплементарного образования комплексов пептидных фрагментов активных белков, приготовленных путем выделения из природного материала или синтетически.

11.4. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Использование аффинной хроматографии для определения констант диссоциации двойных комплексов дегидрогеназ и NADH рассматривалось в гл. 2. Этот метод был недавно разработан Броделиусом и Мосбахом [151].

Определение констант диссоциации на основе объемов элюирования фермента, освобождающегося из колонки с иммобилизованным ингибитором при изменении концентрации растворов свободного ингибитора, детально обсуждается в гл. 4 на примере изучения взаимодействия олигоадениловой кислоты с иммобилизованной полиуридилевой кислотой путем анализа кривых элюирования или взаимодействия нуклеотидов с пептидами с помощью матричной хроматографии. Другой пример — изучение взаимодействий гемоглобина (человека) и его полипептидных цепей с гаптоглобулином, связанным с агарозной матрицей [1200]. Гаптоглобулины (α_2 -гликопротеины плазмы крови многих видов животных) обладают высоким сродством к гемоглобину. Несмотря на то что детально известна трехмерная структура молекулы гемоглобина, очень мало имеется информации о структуре гаптоглобина. В отношении связывающих участков известно, что тяжелые цепи гаптоглобина содержат четыре связывающих центра, т. е. по паре центров на каждый димер $\alpha\beta$ -гемоглобина, однако сродство к α -гемоглобиновой цепи существенно выше, чем к β -цепи.

Изучение механизма взаимодействия между гаптоглобином человека, ковалентно связанным с сефарозой 4В, и гемоглобином человека, а также α - и β -цепями, обработанными *n*-хлормеркурибензоатом, проводилось двумя способами: изучалось связывание с помощью хроматографии на колонке и связывание α -цепей в равновесных условиях. α^+ - и β^+ -Цепи — это цепи, меченные ^{14}C с помощью *n*-хлормеркури- ^{14}C бензойной кислоты. Связывание гемоглобина и α^+ - и β^+ -цепей на иммобилизованном гаптоглобине (38 нмоль гаптоглобина на 1 мл сефарозы 4В) показано на рис. 11.3. Добавление возрастающих количеств гемоглобина приводит к плато насыщения при 1,5 моль гемоглобина на 1 моль гаптоглобина. В этом отношении имеется отличие от стехиометрии насыщенного комплекса гаптоглобина и гемоглобина в растворе, соот-

ветствующей 1 моль гемоглобина или 4 моль α -цепи на 1 моль гаптоглобина. Для иммобилизованного гаптоглобина на 1 моль гаптоглобина связывается в комплекс только 0,39 моль гемоглобина. Различия в связывающей емкости объяснены Тсаписом и др. [1200] денатурацией гаптоглобина при его присоединении к носителю, а также ухудшением пространственной доступности связывающих центров гаптоглобина из-за его слишком близкого рас-

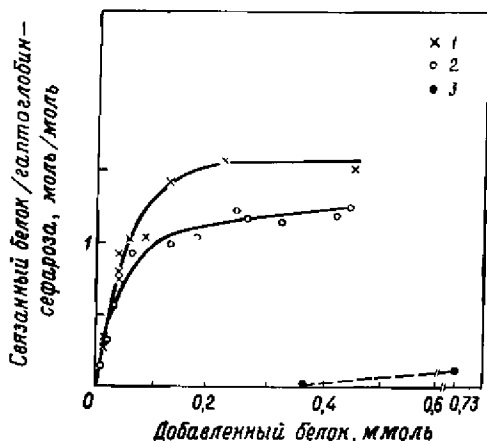


Рис. 11.3. Связывание гемоглобина человека (1) и модифицированных *n*-хлор-меркурибензойной кислотой α -цепи (2) и β -цепи (3) гемоглобина на сефарозе 4В, замещенной гаптоглобином₂₋₁ [1200].

Аликвоты (1 мл) наносились на колонку (1 мл) с сорбентом, избыток несвязавшегося белка элюировался 100 мМ фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 1 ммоль/л ЭДТА

положения к поверхности агарозы. Добавление α^+ -цепей в концентрациях, близких к концентрациям добавлявшегося гемоглобина, приводит к меньшим количествам связанных α^+ -цепей по сравнению с гемоглобином, а плато насыщения не достигается даже при концентрации 0,60 ммоль/л. Связывание β^+ -цепей настолько слабо, что может быть обнаружено только при высоких концентрациях (0,50 и 0,73 ммоль/л). Из этих данных следует тот же ряд аффинностей для иммобилизованного гаптоглобина, что и для свободного, а именно гемоглобин $> \alpha$ -цепь $> \beta$ -цепь.

По насыщению в равновесных условиях рассчитано связывание α^+ -цепей и отсюда количество функционально активного гаптоглобина, равное 14,8 нмоль на 1 мл колонки ($0,39 \times 38$ нмоль). Распределение констант ассоциации K_i выражается соотношением Скатчарда [1008]:

$$r/c = K \cdot n - K \cdot r \quad (11.1)$$

где r — число молекул аффинного лиганда, связанных с функционально активными молекулами иммобилизованного гаптоглобина при концентрации c аффинного лиганда в растворе, а n — максимальное число молекул аффинного лиганда, которые могут быть связаны с молекулами гаптоглобина. График Скатчарда для связывания ^{14}C -меченых α^+ -цепей гаптоглобин — сефарозой 4В приведен на рис. 11.4. В равновесных условиях опыты проводили следующим образом: к 1 мл иммобилизованного гаптоглобина добавляли 1 мл раствора ^{14}C -меченых α^+ -цепей. Концентрация аффинного лиганда (α^+ -цепей) изменялась от 1,66 мкМ до 0,66 мМ. После перемешивания в течение 30 мин при 4°C суспензии разделяли центрифугированием в течение 10 мин (50 об/мин). Концентрацию α^+ -цепей в растворе определяли на основании измерений ^{14}C -радиоактивности. Количество связанных α^+ -цепей рассчитывалось по разности общего содержания добавленных α^+ -цепей и определенным в растворе количеством свободных α^+ -цепей. Одновременно по связыванию таких же количеств человеческого иммуноглобулина G на агарозе в тех же условиях определялись поправки на неспецифическое связывание и включение жидкой фазы в матрицу.

В предположении, что константы ассоциации K_i подчиняются распределению Сипсиана, коэффициент гетерогенности α центров связывания гаптоглобина рассчитывался по уравнению

$$\lg\left(\frac{r}{n-r}\right) = \alpha \lg K_a + \alpha \lg c. \quad (11.2)$$

Вычислено, что $\alpha = 0,72$, а средняя константа аффинности $K_a = 3,6 \cdot 10^4$ л/моль. Форма графика Скатчарда указывает на гетерогенность связывающих центров иммобилизованного гаптоглобина по связыванию α -цепей. Популяция высокоаффинных центров с аффинной константой $K_1 = 5,26 \cdot 10^5$ л/моль, полученной экстраполяцией, мала, а число связывающих центров с низкой аффинностью с константой $K_2 = 6,23 \cdot 10^4$ л/моль велико. Экстраполяция графика до пересечения с осью r показала, что максимальное число центров связывания $n = 4,3$, а число высокоаффинных центров равно 1,5.

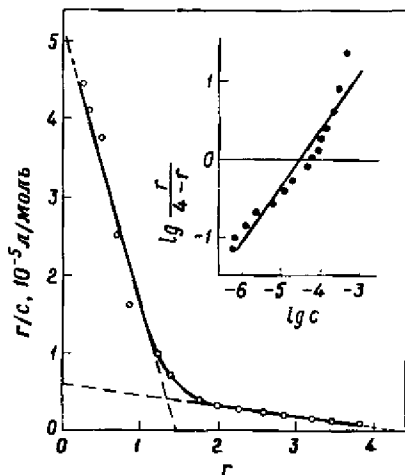


Рис. 11.4. Графики Скатчарда (основной рисунок) и Сипсиана (врезка) связывания ^{14}C - α -цепи гемоглобина на гаптоглобин—сефарозе (см. рис. 11.3 и текст) [1200].

Максимальное число центров связывания, найденное для иммобилизованного гаптоглобина, согласуется с известным значением — четыре центра на 1 молекулу гаптоглобина в растворе. Следовательно, гаптоглобин, присоединенный к агарозе, в целом обладает теми же свойствами по связыванию гемоглобина и его α - и β -цепей, что и в растворе, и вследствие этого пригоден для детального исследования механизма взаимодействия между гаптоглобином и гемоглобином или его субъединицами.

Другие применения аффинной хроматографии включают изучение образования комплексов карбоксипептидазы В с основными и ароматическими аналогами аминокислот [11], определение стерических требований для связывания субстрата антранилат-5-фосфорибозилпирофосфата фосфорибозилтрансферазой на сефарозе с присоединенными производными антралиновой кислоты [761], изучение гистон-гистонных взаимодействий [800], активного центра трипсиногена [192], взаимодействия прогестерон-рецепторных комплексов с нуклеотидами [816] и связывающих центров ацетилхолинэстеразы млекопитающих [528].

11.5. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Для выяснения стадий реакции расщепления АТФ, катализируемой миозином или его ферментативно активными протеолитическими фрагментами, Оплатка и др. [873] присоединили к сефарозе 2В через гидразид адипиновой кислоты [γ - ^{32}P] АТФ, немеченые АТФ, АДФ или аденозин-5'-(β , γ -имино) трифосфат [AMP-P(NH)P]. С помощью ферментативного гидролиза папаином они приготовили из миозина ферментативно активный субфрагмент S-1 тяжелого меромиозина, этот субфрагмент затем тринитрофенилировали. На рис. 11.5 показана хроматография нативного и тринитрофенилированного тяжелого меромиозина S-1 в присутствии либо Mg^{2+} , либо ЭДТА на колонках с АТФ—агарозой, АДФ—агарозой и AMP—P(NH)P—агарозой. Видно что во всех случаях, за исключением колонок с АТФ—агарозой, концентрация хлорида калия, необходимая для элюирования в присутствии Mg^{2+} , $\leq 0,2$ моль/л, а различия в поведении нативного и тринитрофенилированного производного тяжелого меромиозина S-1 незначительны. Для элюирования с колонок с АТФ—агарозой в присутствии Mg^{2+} требовались более высокие концентрации хлорида калия, а именно 0,5 моль/л для нативного и даже 1,6 моль/л для тринитрофенилированного тяжелого меромиозина S-1. Так же соотносились концентрации хлорида калия в элюенте при замене Mg^{2+} на Ca^{2+} , только в этом случае они были ниже. При всех условиях адсорбция обоих белков на колонке с AMP—P(NH)P—агарозой была слабее, чем на колонках с АТФ—агарозой и АДФ—агарозой, а в присутствии Mg^{2+} (или

Ca^{2+}) активный белок лишь частично сорбировался. Неполная сорбция наблюдалась также на сорбенте с присоединенным ADP в присутствии Ca^{2+} . Следовательно, Mg^{2+} и Ca^{2+} значительно повышают сродство миозина и его производных к АТР—агарозе.

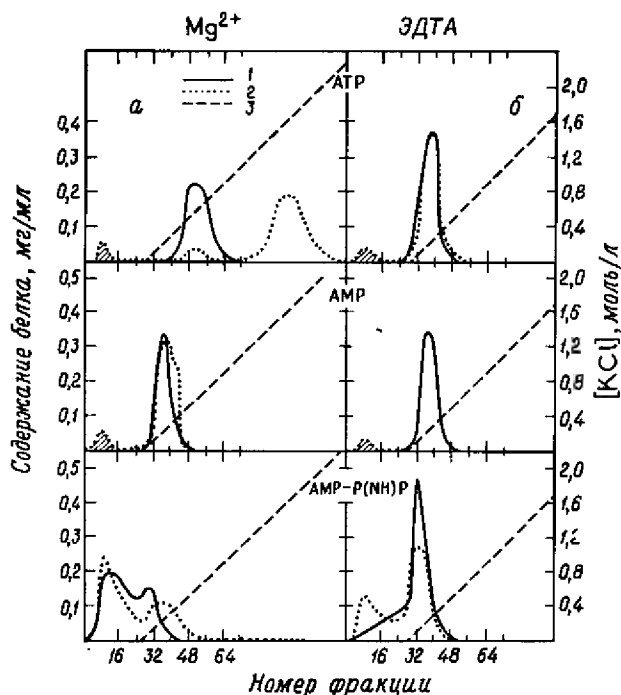


Рис. 11.5. Влияние Mg^{2+} на поведение тяжелого меромиозина S-1 (1) и тринитрофенилированного тяжелого меромиозина S-1 (2) на колонках с АТР-агарозой, АДР-агарозой и АМР-Р(НН)Р-агарозой [873].

6—10 мг белка наносились на колонки (130×9 мм), наполненные нуклеотид-агарозой, предварительно уравновешенные 30 мМ хлоридом калия, 10 мМ имидазолом (рН 7) [или обратным буфером (рН 8) в случае АТР-Р(НН)Р-колонки] и 0,5 мМ ЭДТА+2 мМ Mg^{2+} (а) или 1 мМ ЭДТА (б). После промывки уравновешивающим раствором накладывался градиент концентрации хлорида калия (3), содержание других компонентов раствора не изменялось. Объем фракции 2 мл. Заштрихованные области указывают отсутствие АТРазной активности.

Однако их присутствие не изменяет и даже слегка понижает (особенно Ca^{2+}) сродство к АДР- и АМР-Р(НН)Р-агарозе. Двухвалентные катионы одновременно ускоряют расщепление связанной молекулы АТР как нативным, так и тринитрофенилированным тяжелым меромиозином S-1, что было показано главным образом для агарозы с присоединенными молекулами [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] АТР.

Эти результаты послужили одним из важных оснований для предложения схемы механизма расщепления АТР миозином. Оплатка и др. [873] показали, что в условиях, при которых расщеп-

ляется связанная молекула АТР, белок сорбируется не только на интактной молекуле АТР, но также и на продуктах ее расщепления. Этот тип аффинной хроматографии на иммобилизованном субстрате в условиях, благоприятных для протекания ферментативной реакции, назван *динамической аффинной хроматографией*. Высказано также предположение, что связывание ферментов в этих условиях определяется скорее константой типа константы Михаэлиса, а не константой ассоциации фермента с интактным субстратом. Динамические аффинные колонки, содержащие иммобилизованные субстраты, могут быть безусловно полезными для обнаружения изменений в связывающих участках активных центров ферментов и для разделения и выделения различных изоферментов.

Взаимодействие между миозином и актином, на котором основано превращение химической энергии в механическую энергию в мышце, изучено Боттомли и Трейером [138]. Исследовалось влияние ионной силы на специфическое и обратимое связывание тяжелого меромиозина и миозинового субфрагмента I на сефарозе с иммобилизованным G-актином. Комплексы, образуемые между производными миозина и иммобилизованным G-актином, могут диссоциировать при низких концентрациях АТР и АДФ и пирофосфатов как в присутствии, так и в отсутствие Mg^{2+} . Кроме того, и связанный с сефарозой, и свободный G-актин лишь немного увеличивают Mg^{2+} -стимулируемую АТРазную активность миозина. Такой подход позволяет решить вопрос, обязательно ли комплексобразование между миозином и актином приводит к активации АТРазы.

Аффинная хроматография открывает также новые возможности для изучения превращения протеинкиназы в форму, независимую от циклической АМР, путем хроматографии на N^6 -капронил-3',5'-АМР—сефарозе [1286]. О'Карра и Берри [853], используя сефарозу с присоединенным оксаматным производным, доказали, что NADH индуцирует пируватсвязывающий центр в лактатдегидрогеназе, а также образование «абортного» тройного комплекса фермент—NADH—пируват. Подобным образом аффинная хроматография позволила [778] обнаружить комплексы фермент—реагент для галактозилтрансферазы. Путем изучения влияния концентрации фосфата калия на связывание α -изопропилмалатсинтетазы на L-лейцин—сефарозе найдено [282—283], что высокие концентрации солей вызывают конформационные изменения, затрагивающие лейцинсвязывающий центр. Подобные результаты получены также для биосинтетической треониндезаминазы [931]. Фосфорилирование сукцинил-CoA-синтетазы из каллуса соевых бобов иммобилизованным аденозинтрифосфатом было изучено Видер де Ксифра и др. [1273]. Чен [185] исследовал ренатурацию альдолазы, связанной с агарозой, после денатурации 8 М мочевиной.

Аффинная хроматография применялась также для выделения ферментов, участвующих в некоторых метаболических путях. Например, используя N-(ω -аминогексил)-L-аспартат—сефарозу 6B, Тоса и др. [1183] выделили ферменты, участвующие в метаболизме L-аспарагиновой кислоты (аспарагиназу, аспартазу и аспартат- β -декарбоксилазу).

11.6. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ИНТЕРФЕРОНОВ ФИБРОБЛАСТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ, ИССЛЕДОВАННАЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ С ЛЕКТИНАМИ И ГИДРОФОБНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Интерфероны фибробластов и лейкоцитов человека, индуцируемые комплексом полиинозиновой — полицитидиловой кислот и вирусом, различаются по своей антигенности. Например, антитела, образуемые против интерферона фибробластов, не способны нейтрализовать интерферон лейкоцитов. Антитела, образуемые против препаратов интерферона лейкоцитов, обладают частично перекрестной активностью к интерферону фибробластов, которая, однако, может объясняться присутствием интерферонов фибробластного типа в этих лейкоцитарных препаратах. Причины различий антигенного поведения могут быть обусловлены первичными структурами полипептидных цепей и посттрансляционными модификациями (гликозилизацией) или и тем и другим. Поскольку поверхность белка отражает его первичную структуру, а гидрофобные аминокислоты на поверхности определяют взаимодействия с гидрофобными сорбентами, Янковский и др. [580] решили сравнить поведение обоих интерферонов при гидрофобной хроматографии различного типа. Обзор данных о способности интерферонов лейкоцитов и фибробластов человека, индуцируемых комплексом полиинозиновой и полицитидиловой кислот ($gI_n \cdot gC_n$), а также вирусом Ньюкастлской болезни связываться на различных гидрофобных носителях, приведен в табл. 11.3 (системы А). Хроматографическое поведение всех интерферонов исследовалось на сорбенте, содержащем высокомолекулярный гидрофобный лиганд (бывший сывороточный альбумин, иммобилизованный на бромцианактивированной сефарозе 4В), и двух сорбентах, модифицированных низкомолекулярными лигандами (СН-сефароза 4В и АН-сефароза 4В).

Хроматография на альбумин — агарозе проводилась на колонках ($20 \times 0,9$ см), уравновешенных фосфатным буфером (0,02 М фосфат натрия, рН 7,4, 0,15 М хлорид натрия) при комнатной температуре. Образец интерферона (5 мл), содержащий 125 000 интерфероновых единиц (14 000 ед. в 1 мл образца), наносился на колонку и колонка промывалась уравновешивающим буфером. В первом пике элюировалась большая часть белка, но небольшая часть интерфероновой активности. Активность элюировалась только при подаче на колонку 0,02 М раствора фосфата натрия (рН 7,4), содержащего 1 моль/л хлорида

Таблица 11.3

Связывание интерферонов лейкоцитов и фибробластов человека иммобилизованными гидрофобными лигандами и иммобилизованными лектинами

Хроматографическая система	Специфичность по сахару	Связывание ^a интерферона, источником и индуктором которого являются			
		лейкоциты, г ₁ ·гС ₁₂	лейкоциты, вирус	фибробласты, г ₁ ·гС ₁₂	фибробласты, вирус
А. Иммобилизованные гидрофобные лиганды					
Бычий сывороточный альбумин—агароза	—	—	—	+	+
СН-сефароза 4В	—	—	—	+	+
АН-сефароза 4В	—	±	±	±	+
Б. Иммобилизованные лектины					
Из подковообразного краба	N-Ацетилнейраминовая кислота	—	—	+	+
Из <i>Lotus</i>	L-Фукоза	—	—	±	+
Конканавалин А	L-Манноза	—	—	+	+
Из <i>Bandeiraea simplicifolia</i>	α- и β-D-Галактоза	—	—	—	—
Лектин соевых бобов	N-Ацетилгалактозамин	—	—	—	—
Лектин зародышей пшеницы	N-Ацетилглюкозамин	—	—	—	—

^a + — полное связывание; ± — частичное связывание; — — отсутствие связывания.

натрия и 33 об.% этиленгликоля. Собирали фракции по 1,3 мл при скорости потока $30 \text{ мл} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ [545].

Хроматография интерферона на *CN*-сепарозе [580]. Диализ интерферона фибробластов против фосфатного (солевого) буфера проводился в течение 16 ч при 4°C , затем 1 мл образца, содержащего 12 000 интерфероновых единиц, наносился при комнатной температуре на колонку ($20 \times 0,9 \text{ см}$), уравновешенную раствором, в котором проводился диализ. Этим буферным раствором элюировалась белковая фракция без интерфероновой активности; 41 500 ед. интерферона элюировались 0,02 М фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 1 моль/л хлорида натрия и 50 об.% этиленгликоля. Диализ интерферона лейкоцитов проводился против 0,02 М фосфатного буфера (pH 7,4), при 4°C в течение 16 ч. 8 мл образца, содержащих 4800 ед. интерфероновой активности, наносились на колонку ($20 \times 0,9 \text{ см}$), уравновешенную тем же буфером при комнатной температуре. В первом пике, элюируемом уравновешивающим буфером, элюируется 97% нанесенного белка и 83% нанесенной активности. Пропускание через колонку 0,02 М фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,15 моль/л хлорида натрия, затем того же буфера, содержащего 1 моль/л хлорида натрия, и, наконец, последнего раствора, в который добавлено 50 об.% этиленгликоля, не приводит к дальнейшему элюированию интерфероновой активности.

Хроматография на *АН*-сепарозе проводилась подобным образом. Такой же образец интерферона фибробластов (12 000 ед.) наносился на колонку ($20 \times 0,9 \text{ см}$), уравновешенную фосфатным (солевым) буферным раствором при комнатной температуре. Первый пик содержал 100% нанесенного белка и 72% нанесенной интерфероновой активности. Остающаяся активность белка элюирована 0,02 М фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 1 моль/л хлорида натрия. 2,5 мл диализованного раствора интерферона лейкоцитов (2750 ед.) наносились на колонку ($15 \times 0,9 \text{ см}$), уравновешенную фосфатным (солевым) буферным раствором при комнатной температуре. Первая фракция содержала половину от 73% полученной с колонки интерфероновой активности и 81% нанесенного белка. Остальная активность элюировалась 0,02 М фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 1 моль/л хлорида натрия. Из приведенных результатов следует, что интерферон фибробластов более гидрофобен, чем интерферон лейкоцитов.

Для сопоставления посттрансляционной модификации интерферонов Янковский и др. [580] характеризовали оба интерферона по их способности связываться с различными иммобилизованными лектинами. Эти результаты суммированы в табл. 11.3 системы Б. По отсутствию способности интерферонов лейкоцитов человека связываться с лектинами, различающими как концевые остатки сахаров (подковообразный краб, *Lotus*, *Bandeiraea*), так и внутренние остатки (зародыши пшеницы, соевые бобы, конканавалин А), можно прийти к заключению, что таких остатков сахаров в интерфероне нет. Следовательно, может быть сделан вывод о том, что этот интерферон не является гликопротеином. Напротив, интерферон фибробластов человека является гликопротеином. На основе связывания с лектином подковообразного краба можно предположить, что он содержит остаток сиаловой кислоты. Кроме того, имеется L-фукоза в форме, доступной для связывания специфическими лектинами.

Из данных, приведенных в табл. 11.3, следует, что различия в молекулярных структурах, по-видимому, могут быть обусловлены главным образом типом клеток, в которых индуцируется синтез интерферона. Различия, основанные на индукционном сигнале (ви-

рус или $gI_n \cdot gC_n$) в одинаковых клетках, вероятно, выражены значительно слабее.

Аффинная хроматография была применена также для обнаружения структурных различий [280]. На специфических иммуносорбентах установлены структурные различия между ядерной и митохондриальной глутаматдегидрогеназами. Уаймен и Уоллен [1290] с помощью аффинной хроматографии исследовали соотношения между структурами «глутаминовой» (А) и «лизиновой» (В) форм плазминогена человека и их взаимодействие с N-концевым активационным пептидом. N-Концевой активационный пептид хроматографировали на сефарозе с ковалентно связанным плазминогеном В; 1,0 мкмоль иммобилизованного плазминогена В сорбировал 0,27 мкмоль этого пептида. Адсорбированный пептид мог быть элюирован буфером, содержащим 0,005 моль/л ϵ -аминокапроновой кислоты. Вывод о ее специфическом действии следует из использования для элюирования достаточно низкой концентрацией. При нанесении N-концевого активационного пептида на сефарозу с присоединенным плазминогеном А сорбируется только 0,10 мкмоль. Сорбционная емкость последнего сорбента относительно плазминоген В—сефарозы составляет $\sim 35\%$.

Для того чтобы установить, какая часть активационного пептида ответственна за специфическое взаимодействие, Уаймен и Уоллен [1290] нанесли триптический гидролизат 1 мкмоль активационного пептида на колонку с плазминоген В—сефарозой. Из пяти пептидов, образующихся после гидролиза трипсином, сорбируется только гептапептид Ala-Phe-Glu-Tyr-His-Ser-Lys, который занимает 41—51-положение 81-членного N-концевого пептида. Следовательно, данный пептид ответствен за взаимодействие, которое, по-видимому, имеет важное значение для конформационного состояния молекулы плазминогена.

11.7. ИММУНОАНАЛИЗ

Чрезвычайно чувствительный и избирательный иммуноанализ используется при определении концентраций молекул, к которым могут быть получены антитела. Иммобилизация исследуемого вещества или антитела приводит к значительному упрощению иммуноанализа (радиоиммуноанализ, ферментативный иммуноанализ и метод флуоресцентных антител).

11.7.1. Твердофазный радиоиммуноанализ

Классический иммуноанализ, описанный Ялоу и Берсоном [1299], основан на способности немеченного антигена конкурировать с антигеном, меченным радиоактивным изотопом, при сорбции на связывающих центрах антитела, число которых ограничено.

Следовательно, процесс состоит в ингибировании связывания чистого меченого антигена антителом под влиянием немеченого антигена, содержание которого и определяется. Если система находится в равновесии, радиоактивность, связанная с антителами, отделяется от несвязанной радиоактивности, а затем измеряется одна из них. По этим данным можно рассчитать содержание немеченого антигена в неизвестном образце. Предел обнаружения в методе радиоиммуноанализа 10^{-11} — 10^{-17} моль, т. е. метод позволяет количественно определять большинство биологически активных соединений, которые находятся в биологических системах в нанограммовых и пикограммовых количествах. Метод существенно упрощен благодаря использованию связывания антител на нерастворимых носителях [178, 1272].

Антисыворотки, ковалентно связанные с агарозой, целлюлозой и сефадексом, в системах радиоиммуноанализа белков и гаптенов исследовались Болтоном и Хантером [135]. Показано, что ковалентное связывание с нерастворимой матрицей не оказывает неблагоприятного влияния на антисыворотку. Ухудшение чувствительности анализа обусловлено в большинстве случаев пространственными затруднениями для высокомолекулярных антигенов. Богданов и Страш [131] указали на возможные ошибки радиоиммуноанализа, возникающие из-за большого объема атома радиоактивного иода.

Радиоиммуноанализ становится широко распространенным методом, особенно для наркотиков, гормонов, химиотерапевтических средств, антибиотиков, иммуноглобулина и т. п., как это показано в обзорных статьях и книгах [3, 154, 214, 460, 679].

Примером применения твердофазного радиоиммуноанализа является определение орнитинтранскарбамилазы, синтезируемой в системе транскрипции — трансляции, управляемой геном *arg F*, вводимым специализированным трансдуцирующим бактериофагом [336].

Антиорнитинтранскарбамилазные антитела, связанные ковалентно с сефарозой 4В (0,1 мл), добавляют к испытуемому раствору (общий объем 0,5 мл), концентрация фосфата в котором 0,05 моль/л, хлорида натрия 0,15 моль/л, рН 7,2. Испытуемую смесь перемешивают непрерывно с помощью роторной мешалки со скоростью 5 об/мин в термостате при 33 °С в течение 60 мин, разбавляют 5 мл того же буфера и центрифугируют при 500 *g* в течение 3 мин; супернатант отбрасывают. Сефарозу переносят на фильтр ватман CF/C диаметром 25 мм и промывают 50 мл того же буфера. Измеряют радиоактивность на сцинтилляционном счетчике Beckman LS 230 с жидким сцинтиллятором Beckman Ready-Solv VI.

Описанный метод — быстрый, чувствительный и специфичный к орнитинтранскарбамилазе; он может быть полезен в работах, посвященных выяснению механизма контроля синтеза аргинина, проводимых *in vitro*.

11.7.2. Анализ на иммуносорбенте со связанным ферментом (ЭЛИСА)*

Ингвал и др. [324] применили принцип радиоиммуноанализа, описанный для определения кроличьего иммуноглобулина G; однако вместо меченных радиоактивным изотопом антигенов они конъюгировали последние с ферментом — щелочной фосфатазой. Основой конкурентного иммуноанализа является разделение свободных и связанных с антителами антигенов, так чтобы антигены можно было определить количественно. Это разделение можно облегчить фиксацией антител на твердой фазе путем физической сорбции на стенках полистирольных пробирок.

Иммуноанализ проводят следующим образом. Полистирольные пробирки (80×11 мм) покрываются антителами при обработке 1 мл раствора антител. Растворы антител разбавляют 0,1 М Na-карбонатного буфера (pH 9,8) или фосфатным (солевым) буфером. Пробирки с этими растворами оставляют на 3 ч при 37 °C; для хранения раствор оставляют в пробирках на холоду. Перед определением необходимое число пробирок промывают 0,9%-ным хлоридом натрия, содержащим 0,05% твина 20. В каждую пробирку помещают 0,5 мл одного из следующих растворов: 1) стандартный раствор иммуноглобулина G, 2) неизвестный образец, 3) буферный раствор. После этого добавляют 0,1 мл разбавленного конъюгата щелочной фосфатазы и иммуноглобулина G (приготовленного с помощью сшивания глутаровым альдегидом). Для разбавления используют фосфатный (солевой) буферный раствор, содержащий 1% сыровоточного альбумина человека и 0,02% азида натрия. Пробирки инкубируют при комнатной температуре в течение ночи (16 ч) на роторной мешалке так, чтобы поверхность, покрытая антителами, покрывалась 0,6 мл раствора, находящегося в каждой пробирке. Затем пробирки промывают три раза раствором NaCl-твина. Количество фермента, присоединенного к иммуноглобулину G, связанному стенками пробирок, покрытых антителами, определяют, добавляя 1 мл 0,05 М Na-карбонатного буфера (pH 9,8), содержащего 1 мг/мл п-нитрофенилфосфата и 1 ммоль/л хлорида магния. Через 30 мин реакцию останавливают, добавляя 0,1 мл 1 М NaOH. Измеряют оптическую плотность при 400 нм и строят стандартный график зависимости ферментативной активности (изменение оптической плотности в единицу времени) индивидуальных образцов от содержания в них иммуноглобулина G.

Энзимиммуноанализ для определения растворимых антигенов, имеющих по меньшей мере два центра связывания антител, описан Майолини и Массейефом [751]. Этот метод неконкурентного «сэндвича» состоит из трех стадий: 1) определяемый антиген реагирует с покрытым антителами целлюлозным иммуносорбентом; 2) меченные ферментом антитела инкубируют с антигеном, связанным на твердой фазе; 3) затем измеряют ферментативную активность иммуносорбента. В качестве примера применения этого метода может служить определение α -фетопротейна. Использование ферментативного иммуноанализа позволило Като и др. [619] определять такие небольшие количества иммуноглобулина G человека, как 3 фмоль. Обзор, посвященный количественному ферментативному иммуноанализу, опубликован Шарпе и др. [1012].

* ЭЛИСА соответствует английскому сокращению ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). — *Прим. перев.*

11.7.3. Микрофлуориметрический иммуноанализ

Для того чтобы ликвидировать некоторые недостатки радиоиммуноанализа, такие, как нестабильность радиоактивно меченных белков или денатурацию белков при введении метки, Хайман и Бломмен [466] применили флуоресцентную антисыворотку или антиген вместо радиоактивных. Они изучили два типа флуоресцентного иммуноанализа: флуоресцентный ингибиторный иммуноанализ и флуоресцентный иммуноконкурентный анализ. Первый тип изучен с использованием иммуноглобулина G человека и иммуноглобулина M мыши, а также последнего с овальбумином. В качестве меток применялись флуоресцеин или тетраметилродаминизотиоцианат. Эти методы были в десять раз менее чувствительными, чем радиоиммуноанализ.

Для изучения распределения столбнячных антител по классам иммуноглобулинов был разработан простой иммунофлуоресцентный метод [498].

0,02 мл суспензии антигена, содержащей 10 мг агарозы с иммобилизованным токсином столбняка, смешивают с 0,2 мл разбавленной (обычно 1:10) тестируемой сыворотки и инкубируют 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания гранул геля вероналовым буфером (рН 7,2), содержащим 1 моль/л хлорида натрия, добавляют 0,2 мл кроличьих антител к человеческому иммуноглобулину M, A или G, затем инкубацию и промывку повторяют. Наконец, добавляя 0,2 мл меченных флуоресцеином антител козы к кроличьему иммуноглобулину и инкубацию и промывку повторяют. После последней промывки осадок помещают на предметное стекло и рассматривают в синем свете под флуоресцентным микроскопом. Присутствие специфических антител обнаруживают по ярко-зеленому с флуоресцирующими краями окрашиванию гранул геля.

11.8. СПЕЦИФИЧЕСКОЕ УДАЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БЫЧЬЕМУ СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ (БСА) IN VIVO С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ПРОТОКА ЧЕРЕЗ БСА, ИММОБИЛИЗОВАННЫЙ НА НАЙЛОНОВЫХ МИКРОКАПСУЛАХ

Доказано, что антитела и иммунные комплексы могут быть причиной некоторых болезней. Терапия многих таких иммунологически обусловленных заболеваний связана с использованием иммунодепрессантов, которые неспецифически подавляют иммунную систему хозяина. Другим методом терапии может быть специфическое удаление из кровообращения иммунных веществ, которые при этой болезни и являются патологическими. Шенкейн и др. [1017] удаляли антитела против БСА из плазмы положительно иммунизированных кроликов, пропуская их кровь через иммуносорбент, приготовленный связыванием БСА с бромацетилцеллюлозой. Таким же способом специфически удаляли антитела к ДНК из крови активно иммунизированных кроликов [1163, 1164]. Им-

муносорбенты для удаления антигенов сывороточного гепатита из крови, плазмы крови и продуктов плазмы были приготовлены Шармом и Уонгом [189] путем иммобилизации сыворотки козы с антителами к антигену сывороточного гепатита на сефарозе 2В после активации бромцианом. Удаление веществ из крови аффинной хроматографией изучено в дальнейшем Плотцем и др. [909] и Шаршмидтом и др. [1013]; для удаления билирубина и других веществ, связывающихся альбумином, они использовали альбумин, присоединенный к биогелю А-5m.

Терман и др. [1166] использовали БСА, иммобилизованный на микрокапсулах, для удаления антител против БСА из крови собаки.

Камеру для микрокапсул изготавливали из стеклянной цилиндрической трубки (8×2,5 см) с фильтрами в 40 меш из нержавеющей стали на концах. Эту камеру заполняли ~400 микрокапсулами диаметром 1,0—1,1 мм, а затем соединяли с перистальтическим насосом с помощью полиэтиленовых трубок. Капсулы промывали 2 л воды при 30°C в течение 60 мин; гидролизовали 500 мл 3 М соляной кислоты при циркуляции в течение 60 мин при 30°C и скорости потока 30 мл/мин, а затем капсулы опять промывали водой. 12,5%-ный раствор глутарового альдегида в 0,1 М боратном буфере (pH 8,3) циркулировал через систему в течение 15 мин со скоростью 30 мл/мин при 30°C, а затем капсулы промывали 0,1 М боратым буфером (pH 8,3) при 30°C. После замены трубок добавляли раствор 200 мг БСА, содержащий в качестве маркера 0,2 мкг [¹²⁵I] БСА, в 0,9%-ном растворе хлорида натрия и этот раствор циркулировал через капсулы в течение 30—60 мин. Наконец, через капсулы циркулировали 200 мл 10 мкМ раствора Na₂S₂O₃ со скоростью 200 мл/мин. После промывания 0,9%-ным хлоридом натрия до отсутствия в промывных водах ¹²⁵I (~500 мл) капсулы в растворе переносили в силиконизированную камеру для использования *in vivo*. Таким образом с микрокапсулами связывалось 32,1—34,5 мг БСА.

Схема экстракорпоральной системы *in vivo* показана на рис. 11.6. Собак анестезировали пентобарбиталом натрия; артерию и вену бедра присоединяли с помощью полиэтиленовых трубок широкого диаметра. Гепарин натрия (3 мг/кг) вводили внутривенно и катетеры артерии и вены бедра соединяли с насосом и камерой с микрокапсулами. Камеру перед использованием силиконизировали. Трехходовой кран позволял прерывать кровоток через камеру через 7—12 мин, чтобы предотвратить сопротивление потоку через микрокапсулы, возникающие из-за засорения фильтров. Камеру соединяли с капельницей, а затем с веной бедра. Перед инъекцией антител гепаринизированная кровь 20 мин циркулировала через экстракорпоральную систему. Скорость потока поддерживали 200 мл/мин во время всей процедуры. Образцы крови отбирали из венозной линии и анализировали на содержание антител через различные интервалы времени.

Кроличью антисыворотку против БСА и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) вводили анестезированным собакам одновременно, при разбавлениях, при которых антисыворотка связывает 95% соответствующих ей антигенов. Для анти-БСА — это разбавление 1:520, а для анти-ЧСА — 1:270. После уравнивания в течение 12 мин микросферы БСА вводили в экстракорпоральное кровообращение. Специфическое уменьшение количества БСА-связывающих антител у четырех собак обнаружено в течение первых 15 мин после введения микрокапсул БСА, в последующие 60 мин содержание антител уменьшалось значительно меньше. За те же интервалы времени количество анти-ЧСА оставалось постоянным. Для доказательства того, что наблюдаемое снижение связывающей способности БСА не является следствием отщепления БСА от микрокапсул в ходе эксперимента, жизненно важные органы и сыворотку крови собак анализировали на присутствие ¹²⁵I в конце экспериментов. Никакой суще-

ственной радиоактивности в органах и сыворотке собак не найдено. Перед и после экстракорпоральной циркуляции через микрокапсулы БСА определяли гематокрит и число лейкоцитов у собак; найдены почти одинаковые значения. Только у одной из четырех собак обнаружено уменьшение лейкоцитов. После завершения экспериментов микрокапсулы обследовали на содержание тромбоцитического материала или клеточных обломков, которые, однако, не были обнаружены.

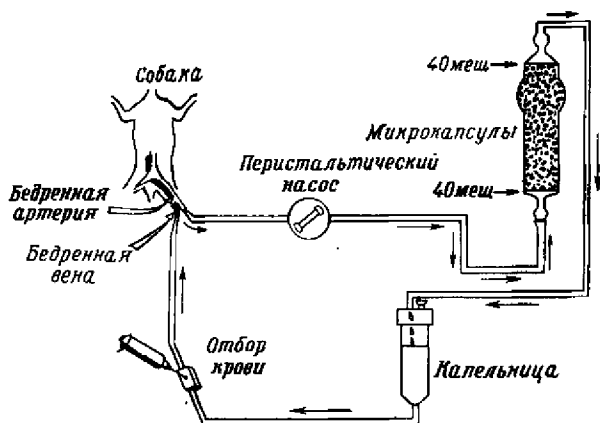


Рис. 11.6. Схема экстракорпоральной системы кровообращения [1166].

По-видимому, иммуносорбенты в будущем могут быть использованы в медицине. Нейлоновые микросферы имеют определенные свойства, которые позволяют применять их в экстракорпоральных системах: большая площадь поверхности позволяет связывать необходимое количество белков; они обладают минимальной токсичностью в отношении организма-хозяина, которая может быть отнесена к химической инертности микрокапсул, и, наконец, устойчивость их структуры уменьшает опасность эмболий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abe S., Nagai Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 125—132 (1972).
2. Abdon N. I., Richter M., *J. Exp. Med.*, **130**, 141—163 (1969).
3. *Handbook of Radioimmunoassay*, G. E. Abraham (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1977, pp. 1—822.
4. Abramovitz A. S., Massey V., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5321—5326 (1976).
5. Adair W. L., Kornfeld S., *J. Biol. Chem.*, **249**, 4696—4704 (1974).
6. Adler A. J., Rich A., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3977—3979 (1962).
7. Agogbua S. I. O., Wynn C. H., *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 405—408 (1975).
8. Agrawal B. B. L., Goldstein I. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 262—271 (1967).
9. Akanuma Y., Glomset J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 639—643 (1968).
10. Akanuma Y., Hayashi M., *Methods Enzymol.*, **34**, 746—750 (1974).

11. *Akanuma Y., Kasuga A., Akanuma T., Yamasaki M.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **45**, 27—33 (1971).
12. *Akanuma Y., Kuzuya T., Hayashi M., Ide T., Kuzuya N.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **38**, 947—953 (1970).
13. *Ako H., Foster R. J., Ryan C. A.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**, 1402—1407 (1972).
14. *Ako H., Foster R. J., Ryan C. A.*, Biochemistry, **13**, 132—139 (1974).
15. *Ako H., Ryan C. A., Foster R. J.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **46**, 1639—1645 (1972).
16. *Alhadeff J. A., Miller A. L., Wenaas H., Vedvick T., O'Brien J. S.*, J. Biol. Chem., **250**, 7106—7113 (1975).
17. *Allan D., Auger J., Crumpton M. J.*, Nature New Biol., **236**, 23—25 (1972).
18. *Allen A. K., Neuberger A.*, FEBS Lett., **50**, 362—364 (1975).
19. *Allen H. J., Johnson E. A. Z.*, Carbohydr. Res., **50**, 121—131 (1976).
20. *Allen H. J., Johnson E. A. Z.*, Biochim. Biophys. Acta, **444**, 374—385 (1976).
21. *Allen R. H., Burger R. L., Mehlman C. S., Majerus P. W.*, Methods Enzymol., **34**, 305—314 (1974).
22. *Allen R. H., Majerus P. W.*, J. Biol. Chem., **247**, 7695—7717 (1972).
23. *Allen R. H., Mehlman C. S.*, J. Biol. Chem., **248**, 3660—3680 (1973).
24. *Anderson C. D., Hall P. L.*, Anal. Biochem., **60**, 417—423 (1974).
25. *Anderson J. C.*, Biochim. Biophys. Acta, **379**, 444—455 (1975).
26. *Anderson J. C., Lee-Own V.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 623—624 (1974).
27. *Andersson L., Jörnvall H., Akeson A., Mosbach K.*, Biochim. Biophys. Acta, **364**, 1—8 (1974).
28. *Andersson L., Jörnvall H., Mosbach K.*, Anal. Biochem., **69**, 401—409 (1975).
29. *Anderton B. H., Hulla F. W., Fasold H., White H. A.*, FEBS Lett., **37**, 338—341 (1973).
30. *Andres R. Y.*, Eur. J. Biochem., **62**, 591—600 (1976).
31. *Andrews P.*, FEBS Lett., **9**, 297—300 (1970).
32. *Andria G., Taniuchi M., Cone J. L.*, J. Biol. Chem., **246**, 7421—7428 (1971).
33. *Anfinsen C. B.*, Pure Appl. Chem., **17**, 461—487 (1968).
34. *Anfinsen C. B., Bose S., Corley L., Gurari-Rotman D.*, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S., **71**, 3139—3142 (1974).
35. *Anttinen H., Kivirikko K. I.*, Biochim. Biophys. Acta, **429**, 750—758 (1976).
36. *Armstrong J. A., Edmonds M., Nakazato H., Phillips B. A., Vaughan M. H.*, Science, **176**, 526—528 (1972).
37. *Arndt-Jovin D. J., Jovin T. M., Bähr W., Frischauf A. M., Marquardt M.*, Eur. J. Biochem., **54**, 411—418 (1975).
38. *Arnon R., Teicher E., Bustin M., Sela M.*, FEBS Lett., **32**, 335—338 (1973).
39. *Arsenis C., McCormick D. B.*, J. Biol. Chem., **239**, 3093—3097 (1964).
40. *Arsenis C., McCormick D. B.*, J. Biol. Chem., **241**, 330—334 (1966).
41. *Ashani Y., Wilson I. B.*, Biochim. Biophys. Acta, **276**, 317—322 (1972).
42. *Aslam S., Jones D. P., Brown T. R.*, Anal. Biochem., **75**, 329—335 (1976).
43. *Aspberg K., Holmén H., Porath J.*, Biochim. Biophys. Acta, **160**, 116—117 (1968).
44. *Aspberg K., Porath J.*, Acta Chem. Scand., **24**, 1839—1841 (1970).
45. *Astell C. R., Doel M. T., Jahnke P. A., Smith M.*, Biochemistry, **12**, 5068—5074 (1973).
46. *Astell C. R., Smith M.*, J. Biol. Chem., **246**, 1944—1946 (1971).
47. *Astell C. R., Smith M.*, Biochemistry, **11**, 4114—4120 (1972).
48. *Aukrust L. E., Norum K. R., Skálhegg B. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **438**, 13—22 (1976).
49. *Aunis D., Miras-Portugal M. T., Mandel P.*, Biochim. Biophys. Acta, **327**, 313—327 (1973).
50. *Aviv H., Leder P.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **69**, 1408—1412 (1972).
51. *Avrameas S., Guilbert B.*, Biochimie, **53**, 603—614 (1971).
52. *Avrameas S., Ternynck T.*, J. Biol. Chem., **242**, 1651—1659 (1967).

53. Aorameas S., Ternynck T., *Immunochemistry*, **6**, 53—66 (1969).
54. Ayad S. R., Parker M. C., *J. Chromatogr.*, **82**, 343—348 (1973).
55. Azuma J., Kashimura N., Komano T., *Biochim. Biophys. Acta*, **439**, 380—392 (1976).
56. Azzar G., Berthillier G., Got R., *J. Chromatogr.*, **104**, 470—473 (1975).
57. Bacchi C. J., Marcus S. L., Lambros C., Goldberg B., Messina L., Hutner S. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 778—786 (1974).
58. Bachman B. K., Lee C. Y., *Anal. Biochem.*, **72**, 153—160 (1976).
59. Baczuk R. J., Landram G. K., Dubois R. J., Dehm H. C., *J. Chromatogr.*, **60**, 351—361 (1971).
60. Baker B. R., Siebeneick H. U., *J. Med. Chem.*, **14**, 799—801 (1971).
61. Balasubramanian K. A., Abraham D., Bachhawat B. K., *Indian J. Biochem. Biophys.*, **12**, 204—206 (1975).
62. Baldo B. A., Uhlenbruck G., *FEBS Lett.*, **55**, 25—29 (1975).
63. Bamberg E., Dorner F., Stöckl W., *Experientia*, **31**, 516—517 (1975).
64. Banerjee D. K., Basu D., *Biochem. J.*, **145**, 113—118 (1975).
65. Bantle J. A., Maxwell I. H., Hahn W. E., *Anal. Biochem.*, **72**, 413—427 (1976).
66. Barker C. R., Worman C. P., Smith J. L., *Immunology*, **29**, 765—777 (1975).
67. Barker R., Chiang C.-K., Trayer I. P., Hill R. L., *Methods Enzymol.*, **34**, 317—328 (1974).
68. Barker R., Olsen K. W., Shaper J. H., Hill R. L., *J. Biol. Chem.*, **247**, 7135—7147 (1972).
69. Barker S. A., Gray C. J., Ireson J., Parker R. C., McLaren J. V., *Biochem. J.*, **139**, 555—563 (1974).
70. Barns R. J., Elmslie R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 815—818 (1976).
71. Barrantes F. J., Arbilla S., De Carlin M. C. L., De Robertis E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **63**, 194—201 (1975).
72. Barrett A. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 52—62 (1974).
73. Barros M. F., Lebon P., *Biomed. Express*, **23**, 184—188 (1975).
74. Barry S., Brodelius P., Mosbach K., *FEBS Lett.*, **70**, 261—266 (1976).
75. Barry S., O'Carra P., *FEBS Lett.*, **37**, 134—139 (1973).
76. Barry S., O'Carra P., *Biochem. J.*, **135**, 595—607 (1973).
77. Bartkowiak S., Pawelkiewicz J., *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 137—140 (1972).
78. Bartling G. J., Barker C. W., *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1023—1027 (1976).
79. Bauer E. A., Eisen A. Z., Jeffrey J. J., *J. Clin. Invest.*, **50**, 2056—2064 (1971).
80. Bauer E. A., Jeffrey J. J., Eisen A. Z., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **44**, 813—818 (1971).
81. Bauknecht H., Oster P., Hackenthal E., *Experientia*, **31**, 600—601 (1975).
82. Baum G., *J. Chromatogr.*, **104**, 105—111 (1975).
83. Bautz E. F. K., Hall B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 400—408 (1962).
84. Bautz E. F. K., Reilly E., *Science*, **151**, 328—330 (1966).
85. Bayer E., Wilchek M., *Methods Enzymol.*, **34**, 265—267 (1974).
86. Baylin S. B., Margolis S., *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 294—306 (1975).
87. Baynes J. W., Wold F., *J. Biol. Chem.*, **251**, 6016—6024 (1976).
88. Bearden J., Jr., Chandra T., *Mol. Cel. Biochem.*, **10**, 3—9 (1976).
89. Beardslee R. A., Zahmley J. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 806—811 (1973).
90. Beaudet A. L., Roufa D. J., Caskey C. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 320—324 (1973).
91. Beeley J. G., McCairns E., *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 204—213 (1972).
92. Befort J. J., Befort N., Petrissant G., Rémy P., Ebel J. P., *Biochimie*, **58**, 625—630 (1974).
93. Behrens M. M., Inman J. K., Vannier W. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 411—419 (1967).
94. Beikirch H., von der Haar F., Gramer F., *Eur. J. Biochem.*, **26**, 182—190 (1972).

95. *Beikirch H., von der Haar F., Cramer F.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 503—506 (1974).
96. *Belew M., Porath J., Sundberg L.*, *Eur. J. Biochem.*, **60**, 247—258 (1975).
97. *Belitsina N. V., Elizarov S. M., Glukhova M. A., Spirin A. S., Butorin A. S., Vasilenko S. K.*, *FEBS Lett.*, **57**, 262—266 (1975).
98. *Bennett V., O'Keefe E., Cuatrecasas P.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 33—37 (1975).
99. *Bennich H., Johansson S. G. O.*, *Advan. Immunol.*, **13**, 1—55 (1971).
100. *Benson A. M., Suruda A. J., Barrack E. R., Talalay P.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 557—566 (1974).
101. *Benson A. M., Suruda A. J., Shaw R., Talalay P.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 317—320 (1974).
102. *Berg K., Ogburn C. A., Paucker K., Mogensen K. E., Cantell K.*, *J. Immunol.*, **114**, 640—644 (1975).
103. *Berg R. A., Prockop D. J.*, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1175—1182 (1973).
104. *Berger E. G., Wetser M. M., Isselbacher K. J.*, *Experientia*, **32**, 690—691 (1976).
105. *Berger M., Wood H. G.*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 927—933 (1975).
106. *Bergeron L., de Medicis E.*, *Can. J. Biochem.*, **52**, 423—428 (1974).
107. *Berglund O.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 7270—7275 (1972).
108. *Berglund O., Eckstein F.*, *Eur. J. Biochem.*, **28**, 492—496 (1972).
109. *Berglund O., Eckstein F.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 253—261 (1974).
110. *Berman J. D.*, *Biochemistry*, **12**, 1710—1715 (1973).
111. *Berman J. D., Young M.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 395—398 (1971).
112. *Bessler W., Goldstein I. J.*, *FEBS Lett.*, **34**, 58—62 (1973).
113. *Best-Belpomme M., Richard-Foy H., Secco-Millett C., Baulieu E. E.*, *Biochimie*, **58**, 863—869 (1976).
114. *Bigelis R., Umbarger H. E.*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4315—4321 (1975).
115. *Bing D. H.*, *J. Immunol.*, **107**, 1243—1249 (1971).
116. *Bing D. H.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 731—746 (1974).
117. *Binz H., Wigzell H.*, *J. Exp. Med.*, **142**, 1231—1240 (1975).
118. *Blanchard J. M., Brissac C., Jeanteur P.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **71**, 1882—1886 (1974).
119. *Blankenhorn G., Osuga D. T., Lee H. S., Feeney R. E.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **388**, 470—478 (1975).
120. *Bloch R., Burger M. M.*, *FEBS Lett.*, **44**, 286—289 (1974).
121. *Bloch R., Burger M. M.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 13—19 (1974).
122. *Bloch R., Jenkins J., Roth J., Burger M. M.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5929—5935 (1976).
123. *Blumberg P. M., Ann N. Y. Acad. Sci.*, **235**, 310—325 (1974).
124. *Blumberg S., Hildesheim J., Yario J., Wilson K. J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 171—176 (1972).
125. *Blumberg S., Schechter I., Berger A.*, *Israel J. Chem. (Proc.)*, **7**, 125P (1969).
126. *Blumberg S., Schechter I., Berger A.*, *Eur. J. Biochem.*, **15**, 97—102 (1970).
127. *Blumberg P. M., Strominger J. L.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **69**, 3751—3755 (1972).
128. *Blumberg P. M., Strominger J. L.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 401—405 (1974).
129. *Bobb D.*, *Prep. Biochem.*, **2**, 347—354 (1972).
130. *Bodanszky A., Bodanszky M.*, *Experientia*, **26**, 327 (1970).
131. *Bogdanowa E. M., Strash A. M.*, *Nature (London)*, **257**, 426—427 (1975).
132. *Boegman R. J.*, *FEBS Lett.*, **53**, 99—101 (1975).
133. *Boegman R. J., Crumpton M. J.*, *Biochem. J.*, **120**, 373—379 (1970).
134. *Böhme H. J., Kopperschläger G., Schulz J., Hofmann E.*, *J. Chromatogr.*, **69**, 209—214 (1972).
135. *Bolton A. E., Hunter W. M.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **329**, 318—330 (1973).

136. Borchardt R. T., Cheng C., Thakker D. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 69—77 (1975).
137. Bosch L., van der Wende G., Bloemendal H., Nature (London), 191, 349—352 (1961).
138. Bottomley R. C., Trayer I. P., Biochem. J., 149, 365—379 (1975).
139. Brandt H., Capulong Z. L., Lee E. Y. C., J. Biol. Chem., 250, 8038—8044 (1975).
140. Brattain M. G., Marks M. E., Pretlow T. G., Anal. Biochem., 72, 346—352 (1976).
141. Brenna O., Perrella M., Pace M., Pietta P. G., Biochem. J., 151, 291—296 (1975).
142. Breslow J. L., Sloan H. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 919—925 (1972).
143. Brishammar S., Juntti N., Biochim. Biophys. Acta, 383, 351—358 (1975).
144. Brockes J. P., Hall Z. W., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 72, 1368—1372 (1975).
145. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M., Biochem. J., 133, 573—584 (1973).
146. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierstan M. P. J., Crook E. M., Methods Enzymol., 34, 531—544 (1974).
147. Brockway W. J., Castellino F. J., Arch. Biochem. Biophys., 151, 194—199 (1972).
148. Brodelius P., Larsson P. O., Mosbach K., Eur. J. Biochem., 47, 81—89 (1974).
149. Brodelius P., Mosbach K., FEBS Lett., 35, 223—226 (1973).
150. Brodelius P., Mosbach K., Acta Chem. Scand., 27, 2634—2638 (1973).
151. Brodelius P., Mosbach K., Anal. Biochem., 72, 629—636 (1976).
152. Brook D. F., Large P. J., Eur. J. Biochem., 55, 601—609 (1975).
153. Brophy P. J., Vance D. E., FEBS Lett., 62, 123—125 (1976).
154. Broughton A., Strong J. E., Clin. Chem., 22, 725—729 (1976).
155. Brun G. M., Assair L. M., Chapeville F., J. Biol. Chem., 250, 7320—7323 (1975).
156. Brunngraber E. G., Susz J. P., Javaid J., Aro A., Warecka K., J. Neurochem., 24, 805—806 (1975).
157. Brunngraber E. G., Susz J. P., Warecka K., J. Neurochem., 22, 181—182 (1974).
158. Buonocore V., Poerio E., Gramenzi F., Silano V., J. Chromatogr., 114, 109—114 (1975).
159. Burger M. M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 62, 994—1001 (1969).
160. Burger R. L., Allen R. H., Biol. Chem., 249, 7220—7227 (1974).
161. Bürgisser E., Fauchere J. L., Helv. Chim. Acta, 59, 760—765 (1976).
162. Burns A. T. H., Williamson R., Nucl. Acids Res., 2, 2251—2255 (1975).
163. Burrell H. R., Horowitz J., FEBS Lett., 49, 306—309 (1975).
164. Bussey H., Rimerman R. A., Hatfield G. W., Anal. Biochem., 64, 380—388 (1975).
165. Bustin M., Glvol D., Biochim. Biophys. Acta, 263, 459—467 (1972).
166. Bustin M., Kupfer H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 68, 718—723 (1976).
167. Campbell P. A., Grey H. M., Cell Immunol., 5, 171—179 (1972).
168. Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 37, 575—578 (1951).
169. Caputo A., Zupi G., Cianciulli A., Nucl. Acids Res., 2, 905—913 (1975).
170. Cardinaud R., Holguin J., Biochem. J., 127, 30P (1972).
171. Carlsson J., Olsson I., Axén R., Drevin H., Acta Chem. Scand., 30, 180—182 (1976).
172. Carlsson J., Svenson A., FEBS Lett., 42, 183—186 (1974).
173. Carmichael G. G., J. Biol. Chem., 250, 6160—6167 (1975).

174. Carmichael G. G., Weber K., Niveleau A., Wahba A. J., J. Biol. Chem., **250**, 3607—3612 (1975).
175. Caron M., Fabia F., Faure A., Cornillot P., J. Chromatogr., **87**, 239—242 (1973).
176. Casati P., Grandi M., Toccaceli N., Ital. J. Biochem., **24**, 188—198 (1975).
177. Cavalieri L. F., Carroll E., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **67**, 807—812 (1970).
178. Catt K., Niall H. D., Tregear G. W., Biochem. J., **100**, 31c—33c (1966).
179. Čechová D., Collect. Czech. Chem. Comm., **39**, 647—652 (1974).
180. Centeno E. R., Sehon A. H., Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., **25**, 729 (1966).
181. Cerami A., J. Biol. Chem., **244**, 221—222 (1969).
182. Chaiken I. M., Methods Enzymol., **34**, 631—638 (1974).
183. Champagnol F., J. Chromatogr., **120**, 489—490 (1976).
184. Chan P. H., Hassid W. Z., Anal. Biochem., **64**, 372—379 (1975).
185. Chan W. W.-C., Biochem. Biophys. Res. Comm., **41**, 1198—1204 (1979).
186. Chan W. W.-C., Takahashi M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **37**, 272—277 (1969).
187. Chan W. W.-C., Takahashi M., Methods Enzymol., **34**, 394—398 (1974).
188. Chang H. W., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **71**, 2113—2117 (1974).
189. Charm S. E., Wong B. L., Biotechn. Bioeng., **16**, 593—607 (1974).
190. Chauvet J., Acher R., FEBS Lett., **23**, 317—320 (1972).
191. Chauvet J., Acher R., Biochimie, **55**, 1323—1324 (1973).
192. Chauvet J., Acher R., Int. J. Peptide Protein Res., **6**, 37—41 (1974).
193. Chauvet J., Dostal J. P., Acher R., Int. J. Peptide Protein Res., **8**, 45—55 (1976).
194. Chello P. L., Cashmore A. R., Jacobs S. A., Bertino J. R., Biochim. Biophys. Acta, **268**, 30—34 (1972).
195. Chen R. F., J. Biol. Chem., **242**, 173—181 (1967).
196. Cheng S. L., Stroupe S. D., Westphal U., FEBS Lett., **64**, 380—384 (1976).
197. Cheng W. C., Fraser K. J., Haber E., J. Immunol., **111**, 1677—1689 (1973).
198. Cheng W. C., Talmage D. W., J. Immunol., **97**, 778—790 (1966).
199. Cheng W. C., Webb E., Vedros N., Ng J., J. Immunol., **114**, 1497—1505 (1975).
200. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Биохимия, **33**, 761—765 (1968).
201. Черкасов И. А., Кравченко Н. А., Биохимия, **34**, 1089—1091 (1969).
202. Cheshner J. M. E., Trayer I. P., Welker D. G., Biochem. Soc. Trans., **1**, 876 (1973).
203. Chibata I., Tosa T., Matuo Y., Methods Enzymol., **34**, 267—271 (1974).
204. Chibata I., Tosa T., Sato T., Sano R., Yamamoto K., Matuo Y., Methods Enzymol., **34**, 405—411 (1974).
205. Chibber B. A. K., Deutsch D. G., Mertz E. R., Methods Enzymol., **34**, 424—432 (1974).
206. Chin C. C., Warren J. C., Steroids, **22**, 373—378 (1973).
207. Chirikjian J. G., Rye L., Papas T. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 1142—1146 (1975).
208. Choy P. C., Vance D. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **72**, 714—719 (1976).
209. Christensen J. M., Hippe E., Olesen H., Rye M., Haber E., Lee L., Thomson J., Biochem. Biophys. Acta, **303**, 319—332 (1973).
210. Chu A. E., Chaykin S., Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., **31**, 468 (1972).
211. Chua G. K., Bushuk W., Biochem. Biophys. Res. Comm., **37**, 545—550 (1969).
212. Ciftanova N., Grigorova A. M., Benassayag C., Nunez E., Jayle M. F., FEBS Lett., **41**, 21—24 (1974).
213. Claeysens M., Kesters-Hilderson A., Van Wauwe J., De Bruyne C. K., FEBS Lett., **11**, 336—338 (1970).

214. Cleeland R., Christenson J., Usategui-Gomez M., Heveran J., Davis R., Grunberg E., Clin. Chem., 22, 712—725 (1976).
215. Clemens L. E., Kleinsmith L. J., Nature New Biol., 237, 204—206 (1972).
216. Closset J., Vandalem J. L., Hennen G., Biochem. Soc. Trans., 2, 913—915 (1974).
217. Closset J., Vandalem J.-L., Hennen G., Lequin R. M., Eur. J. Biochem., 57, 325—333 (1975).
218. Coffin J. M., Parsons J. T., Rymo L., Haroz R. K., Weissmann C., J. Mol. Biol., 86, 373—396 (1974).
219. Cohen L. H., Smits D. P. E. M., Bloemendal H., Eur. J. Biochem., 67, 563—572 (1976).
220. Cole K. W., Gaertner F. H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 170—175 (1975).
221. Collen D., Kudryk B., Hessel B., Blombäck B., J. Biol. Chem., 250, 5808—5817 (1975).
222. Collen D., Ong E. B., Johnson A. J., Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., 31, 229 (1972).
223. Collier R., Kohlhaw G., Anal. Biochem., 42, 48—53 (1971).
224. Comer M. J., Craven D. B., Harvey M. J., Atkinson A., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 55, 201—209 (1975).
225. Comoglio S., Massaglia A., Rolleri E., Rosa U., Biochim. Biophys. Acta, 420, 246—257 (1976).
226. Coombe R. G., George A. M., Anal. Biochem., 75, 652—655 (1976).
227. Corbin J. D., Brostrom C. O., Alexander R. L., Krebs E. G., J. Biol. Chem., 247, 3736—3743 (1972).
228. Cornelius D. A., Brown W. H., Shrake A. F., Rupley J. A., Methods Enzymol., 34, 639—645 (1974).
229. Cornell R., Charm S. E., Biotechnol. Bioeng., 18, 1171—1173 (1976).
230. Corvol P., Devaux C., Menard J., FEBS Lett., 34, 189—192 (1973).
231. Cotton R. G. H., FEBS Lett., 44, 290—292 (1974).
232. Cotton R. G. H., Graftan P. J., Eur. J. Biochem., 60, 427—430 (1975).
233. Cowie D. B., Truffa-Bachi P., Costrejean J. M., Py M. C., Cohen G. N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 53, 188—193 (1973).
234. Crane L. J., Bettinger G. E., Lampen J. O., Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 220—227 (1973).
235. Craven D. B., Harvey M. J., Dean P. D. G., FEBS Lett., 38, 320—324 (1974).
236. Craven D. B., Harvey M. J., Lowe C. R., Dean P. D. G., Eur. J. Biochem., 41, 329—333 (1974).
237. Crook N. E., Chidlow J. W., Stephen J., Smith H., Immunochemistry, 9, 749—752 (1972).
238. Crum E. D., McGregor D. M. C., Cell. Immunol., 23, 211—222 (1976).
239. Cuatrecasas P., Biochem. Biophys. Res. Comm., 35, 531—537 (1969).
240. Cuatrecasas P., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69, 1277—1281 (1972).
241. Cuatrecasas P., Biochemistry, 12, 1312—1323 (1973).
242. Cuatrecasas P., Illiano G., Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 178—184 (1971).
243. Cuatrecasas P., Illiano G., J. Biol. Chem., 246, 4938—4946 (1971).
244. Cuatrecasas P., Jacobs S., Bennett V., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 72, 1739—1743 (1975).
245. Cuatrecasas P., Parikh I., Methods Enzymol., 34, 653—670 (1974).
246. Cuatrecasas P., Parikh I., Hollenberg M. D., Biochemistry, 12, 4253—4264 (1973).
247. Cuatrecasas P., Wilchek M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 33, 235—239 (1968).
248. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 61, 636—643 (1968).

249. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., **244**, 4316—4329 (1969).
250. Cukor G., Readio J. D., Kuchler R. J., Biotechnol. Bioeng., **16**, 925—931 (1974).
251. Damus P. S., Wallace G. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., **61**, 1147—1153 (1974).
252. Danenberg P. V., Heidelberger C., Methods Enzymol., **34**, 520—523 (1974).
253. Danenberg P. V., Langenbach R. J., Heidelberger C., Biochem. Biophys. Res. Comm., **49**, 1029—1033 (1972).
254. Dann J. G., Harding N. G. L., Newbold P. C. H., Whiteley J. M., Biochem. J., **127**, 28P—29P (1972).
255. Das K., Dunnill P., Lilly M. D., Biochim. Biophys. Acta, **397**, 277—287 (1975).
256. Davey M. W., Huang J. W., Sulkowski E., Carter W. A., J. Biol. Chem., **249**, 6354—6355 (1974).
257. Davey M. W., Sulkowski E., Carter W. A., J. Virol., **17**, 439—445 (1976).
258. Davey M. W., Sulkowski E., Carter W. A., Biochemistry, **15**, 704—713 (1976).
259. Damson R. M., Crone H. D., J. Chromatogr., **92**, 349—354 (1974).
260. Dawson G., Propper R. L., Dorfman A., Biochem. Biophys. Res. Comm., **54**, 1102—1110 (1973).
261. Dean P. D. G., Lome C. R., Biochem. J., **127**, 11P—12P (1972).
262. De Buysscher E. V., Berman D. T., Am. J. Vet. Res., **36**, 1659—1661 (1975).
263. Deeley R. G., Mullinix K. P., Wetekam W., Kronenberg H. M., Meyers M., Eldridge J. D., Gordberger R. F., J. Biol. Chem., **250**, 9060—9066 (1975).
264. De Flora A., Giuliano F., Morelli A., Ital. J. Biochem., **22**, 258—270 (1973).
265. Dehm P., Olsen B. R., Prockop D. J., Eur. J. Biochem., **46**, 107—116 (1974).
266. De Jonge H. R., FEBS Lett., **53**, 237—242 (1975).
267. Dellweg H., John M., Schmidt J., Eur. J. Appl. Microbiol., **1**, 191—198 (1975).
268. Delmotte F., Kieda C., Monsigny M., FEBS Lett., **53**, 324—330 (1975).
269. Den H., Malinzak D. A., Rosenberg A., J. Chromatogr., **111**, 217—222 (1975).
270. Denburg J., De Luca M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **67**, 1057—1062 (1970).
271. Der Terrossian E., Pradel L. A., Kasseb R., Desvages G., Eur. J. Biochem., **45**, 243—251 (1974).
272. Détrait J., Boguet P., C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér D, **274**, 1765—1767 (1972).
273. Deutsch D. G., Fogelman D. J., von Kaulla K. N., Biochem. Biophys. Res. Comm., **50**, 758—764 (1973).
274. Deutsch D. G., Mertz E. T., Science, **170**, 1095—1096 (1970).
275. Deutsch D. G., Mertz E. T., Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., **29**, 647 (1970).
276. Devaux C., Corvol P., Auzan C., Ducloux J., Menard J., C. R. Acad. Sci. (Paris), Sér. D, **277**, 2561—2564 (1973).
277. Devaux C., Ménard J., Sicard P., Corvol P., Eur. J. Biochem., **64**, 621—627 (1976).
278. Dharmgrongartama B., Mahadik S. P., Srinivasan P. R., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **70**, 2845—2849 (1973).
279. Dills W. L., Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G., Biochem. Biophys. Res. Comm., **62**, 70—77 (1975).
280. Di Prisco G., Casola L., Biochemistry, **14**, 4679—4683 (1975).
281. Doellgast G. J., Fishman W. H., Biochem. J., **141**, 103—112 (1974).
282. Doellgast G., Kohlhaw G., Fed. Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., **31**, 424 (1972).

283. Doellgast G., Kohlhaw G., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., **31**, 1159 (1972).
284. Doellgast G. J., Plaut A. G., Immunochemistry, **13**, 135—139 (1976).
285. Dolder F., Biochim. Biophys. Acta, **236**, 675—685 (1971).
286. Dolly J. O., Barnard E. A., FEBS Lett., **57**, 267—271 (1975).
287. Don M., Masters C. J., Biochim. Biophys. Acta, **384**, 25—36 (1975).
288. Donnelly E. H., Goldstein I. J., Biochem. J., **118**, 679—680 (1970).
289. Doyle R. J., Birdsall D. C., Young F. E., Prep. Biochem., **3**, 13—18 (1973).
290. Dresser D. W., Nature (London), **229**, 630—632 (1971).
291. Drocourt J.-L., Leng M., Eur. J. Biochem., **56**, 149—155 (1975).
292. Dube S. K., Nordin P., Arch. Biochem. Biophys., **94**, 121—127 (1961).
293. Duckworth W. C., Heinemann M. A., Kitabchi A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **69**, 3698—3702 (1972).
294. Dudai Y., Silman I., Methods Enzymol., **34**, 571—580 (1974).
295. Dudai Y., Silman I., Kalderon N., Blumberg S., Biochim. Biophys. Acta, **268**, 138—157 (1972).
296. Dudai Y., Silman I., Shinitzky M., Blumberg S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **69**, 2400—2403 (1972).
297. Dufau M. L., Ryan D. W., Baukal A. J., Catt K. J., J. Biol. Chem., **250**, 4822—4824 (1975).
298. Dufau M. L., Tsuruhara T., Catt K. J., Biochim. Biophys. Acta, **278**, 281—292 (1972).
299. Dunn B. M., Chaiken I. M., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **71**, 2382—2385 (1974).
300. Dunn B. M., Chaiken I. M., Biochemistry, **14**, 2343—2349 (1975).
301. Dunn J. J., J. Biol. Chem., **251**, 3807—3814 (1976).
302. Dunnill P., Lilly M. D., Biotechnol. Bioeng., **16**, 987—990 (1974).
303. Dus K., Goewert R., Wesver C. C., Carey D., Appleby C. A., Biochem. Biophys. Res. Comm., **69**, 437—445 (1976).
304. Dziegielewski T., Jakubowski H., J. Chromatogr., **103**, 364—367 (1975).
305. Eckstein F., Frischauf A. M., Methods Enzymol., **34**, 605—610 (1974).
306. Eckstein H., Schott H., Bayer E., Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem., **356**, 91—94 (1975).
307. Edelman M., Methods Enzymol., **34**, 499—502 (1974).
308. Edelman M., Anal. Biochem., **65**, 293—297 (1975).
309. Edelman G. M., Rutishauer U., Methods Enzymol., **34**, 195—225 (1974).
310. Edelman G. M., Rutishauer U., Millette C. F., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 2153—2157 (1971).
311. Edgar D. H., Hope D. B., FEBS Lett., **49**, 145—148 (1974).
312. Edmonds M., Caramela M. G., J. Biol. Chem., **244**, 1314—1324 (1969).
313. Edmonds M., Vaughan M. H., Nakazato H., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 1336—1340 (1971).
314. Edmondson D., Massey V., Palmer G., Beacham L. M., Elion G. B., J. Biol. Chem., **247**, 1597—1604 (1972).
315. Edwards R. G., Thomas P., Westwood J. H., Biochem. J., **151**, 145—148 (1975).
316. Egelrud T., Olivecrona T., J. Biol. Chem., **247**, 6212—6217 (1972).
317. Egly J. M., Krieger O., Kempf J., FEBS Lett., **53**, 64—68 (1975).
318. Egorov T. A., Svenson A., Ryden L., Carlsson J., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 3029—3033 (1975).
319. Eipper B. A., Mains R. E., Guenzi D., J. Biol. Chem., **251**, 4121—4126 (1976).
320. Eisen A. Z., Bauer E. A., Strichlin G. P., Jeffrey J. J., Methods Enzymol., **34**, 420—424 (1974).
321. Eisen H. J., Glinsmann W., Biochem. Biophys. Res. Comm., **70**, 367—372 (1976).
322. Elbein A. D., Mitchell M., Arch. Biochem. Biophys., **168**, 369—377 (1975).

323. Eldjarn L., Jellum E., *Acta Chem. Scand.*, **17**, 2610—2621 (1963).
324. Engvall E., Johnsson K., Perlmann P., *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 427—434 (1971).
325. Ensinger M. J., Moss B., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5283—5291 (1976).
326. Entlicher G., Kocourek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 272—281 (1970).
327. Entlicher G., Koštír J. V., Kocourek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 272—281 (1970).
328. Entlicher G., Tichá M., Koštír J. V., Kocourek J., *Experientia*, **25**, 17—19 (1969).
329. Er-El Z., Shaltiel S., *FEBS Lett.*, **40**, 142—145 (1974).
330. Er-El Z., Zaidebzaig Y., Shaltiel S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 383—390 (1972).
331. Erhan S. L., Northrup L. G., Leach F. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **53**, 646—652 (1965).
332. Erickson J. S., Mathews C. K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 1164—1170 (1971).
333. Erickson R. P., Steers E., Jr., *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 399—408 (1970).
334. Ersson B., Aspberg K., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 446—452 (1973).
335. Ersson B., Porath J., *FEBS Lett.*, **48**, 126—129 (1974).
336. Eshenbaugh D. L., Sens D., James E., *Advan. Exp. Med. Biol.*, **42**, 61—73 (1974).
337. Eshhar Z., Waks T., Bustin M., *Methods Enzymol.*, **34**, 750—755 (1974).
338. Etienne J., Breton M., Vanhove A., Polonovski J., *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, Ser. D, **279**, 1487—1490 (1974).
339. Etienne J., Breton M., Vanhove A., Polonovski J., *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 198—204 (1976).
340. Etzler M. E., Kabat E. A., *Biochemistry*, **9**, 869—877 (1970).
341. Evans W. H., Mage M. G., Peterson E. A., *J. Immunol.*, **102**, 899—907 (1969).
342. Evenloff W., Olsen K. W., Hackert M. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 327—331 (1974).
343. Failla D., Tomkins G. M., Santl D. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 3849—3852 (1975).
344. Fainaru M., Glangeaud M. C., Eisenberg S., *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 432—443 (1975).
345. Falkbring S. O., Göthe P. O., Nyman P. O., Sundberg L., Porath J., *FEBS Lett.*, **24**, 229—235 (1972).
346. Fannin F. F., Diedrich D. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 919—921 (1973).
347. Fauci A. S., Frank M. M., Johnson J. S., *J. Immunol.*, **105**, 215—220 (1970).
348. Faust C. H., Tengerdy R. P., *Immunochemistry*, **7**, 744—746 (1970).
349. Faust C. H., Jr., Vassalli P., Mach B., *Experientia*, **28**, 745 (1972).
350. Favorov V. V., *Int. J. Biochem.*, **4**, 107—110 (1973).
351. Fedoroff N. V., Zinder N. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 1838—1843 (1971).
352. Feinstein G., *FEBS Lett.*, **7**, 353—355 (1970).
353. Feinstein G., *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 224—227 (1970).
354. Feinstein G., *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 74—77 (1971).
355. Feinstein G., *Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors*, Munich, 1970. W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971, pp. 38—42.
356. Feinstein G., Gertler A., *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 196—202 (1973).
357. Feizi T., Kabat E. A., *J. Immunol.*, **112**, 145—150 (1974).
358. Fellows R. E., Klingensmith G. J., Williams F. M., *Endocrinology*, **92**, 431—438 (1973).
359. Felsied R. L., Leavitt R. D., Bachur N. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 72—81 (1975).
360. Fey H., Wetzstein H. P., *Med. Microbiol. Immunol.*, **161**, 73—78 (1975).

361. *Findblay J. B. C.*, J. Biol. Chem., **249**, 4398—4403 (1974).
362. *Fink E., Jaumann E., Fritz H., Ingrisch H., Werle E.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1591—1594 (1971).
363. *Fink E., Schiessler H., Arnhold M., Fritz H.*, Hoppe-Seyler's Physiol. Chem., **353**, 1633—1637 (1972).
364. *Fisch H. U., Pliska V., Scwyzer R.*, Eur. J. Biochem., **30**, 1—6 (1972).
365. *Flavell R. A., van den Berg F. M.*, FEBS Lett., **58**, 90—93 (1975).
366. *Foglietti M. J., Girerd H., Percheron F.*, Biochimie, **57**, 667—668 (1975).
367. *Forget B. G., Housman D., Benz E. J., Jr., McCaffrey R. P.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 984—988 (1975).
368. *Fornstedt N., Porath J.*, FEBS Lett., **57**, 187—191 (1975).
369. *Forrester P. I., Hancock R. L.*, Can. J. Biochem., **51**, 231—234 (1973).
370. *Forrester P. I., Hancock R. L., Hay D. M., Lai P. C. W., Lorscheider F. L.*, Clin. Chim. Acta, **64**, 317—323 (1975).
371. *Franek F.*, Eur. J. Biochem., **19**, 176—183 (1971).
372. *Franek F.*, Eur. J. Biochem., **33**, 59—66 (1973).
373. *Frank J. J., Levy C. C.*, J. Biol. Chem., **251**, 5745—5751 (1976).
374. *Fransson L. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **437**, 106—115 (1976).
375. *Fredrick J. F.*, Plant Sci. Lett., **5**, 131—135 (1975).
376. *Frenkel R.*, Arch. Biochem. Biophys., **162**, 392—400 (1974).
377. *Frénoy J. P., Ménard J., Pesquiès P., Corvol P.*, Eur. J. Biochem., **43**, 371—375 (1974).
378. *Fressinaud P. H., Corvol P., Frenoy J. P., Ménard J.*, Biochim. Biophys. Acta, **317**, 572—576 (1973).
379. *Fridkin M., Cashion P. J., Agarwal K. L., Jay E., Khorana H. G.*, Methods Enzymol., **34**, 645—649 (1974).
380. *Fritz H., Brey B., Béress L.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**, 19—30 (1972).
381. *Fritz H., Brey B., Schmal A., Werte E.*, Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem., **350**, 617—625 (1969).
382. *Fritz H., Förg-Brey B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**, 901—905 (1972).
383. *Fritz H., Gebhardt B. M., Fink E., Schramm W., Werle E.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 129—138 (1969).
384. *Fritz H., Gebhardt M., Meister R., Ilchmann K., Hochstrasser K.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 571—574 (1970).
385. *Fritz H., Hochstrasser K., Werle E., Brey E., Gebhardt B. M.*, Z. Anal. Chem., **243**, 452—463 (1968).
386. *Fritz H., Schult H., Hutzel M., Wiedemann M., Werle E.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **348**, 308—312 (1967).
387. *Fritz H., Schult H., Neudecker M., Werle E.*, Angew. Chem., **78**, 775 (1966).
388. *Fritz H., Wunderer G., Dittmann B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**, 893—900 (1972).
389. *Frommell D., Dupuy J. M., Litman G. W., Good R. A.*, J. Immunol., **105**, 1292—1293 (1970).
390. *Frost R. G., Reitherman R. W., Miller A. L., O'Brien J. S.*, Anal. Biochem., **69**, 170—179 (1975).
391. *Fuchs J. A.*, Nature New Biol., **238**, 69—71 (1972).
392. *Fuchs S., Aharonov A., Sela M., von der Haar F., Cramer F.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **71**, 2800—2802 (1974).
393. *Fuchs S., Bonavida B., Sela M., Ziv E., Rappaport S., Lapidot Y.*, Israel J. Med. Sci., **7**, 636—637 (1971).
394. *Fuchs Y., Gertmann E.*, Plant. Cell. Physiol., **15**, 629—633 (1974).
395. *Fujita Y., Oishi K., Suzuki K., Imahori H.*, Biochemistry, **14**, 4465—4470 (1975).
396. *Fujiwara K., Osue K., Tsuru D.*, J. Biochem. (Tokyo), **77**, 739—743 (1975).
397. *Fujiwara K., Tsuru D.*, J. Biochem. (Tokyo), **76**, 883—886 (1974).

398. Fukami H., Itano H. A., *Biochemistry*, **15**, 3529—3535 (1976).
399. Furie B. C., Furie B., *Methods Enzymol.*, **34**, 592—594 (1974).
400. Furie B. C., Furie B., *J. Biol. Chem.*, **250**, 601—608 (1975).
401. Gadasi H., Oplatka A., Lamed R., Muhrad A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 913—918 (1974).
402. Gadski R. A., Chae C. B., *Biochemistry*, **15**, 3812—3817 (1976).
403. Galbraith W., Goldstein I. J., *FEBS Lett.*, **9**, 197—201 (1970).
404. Gallop R. G. C., Tozer B. T., Stephen J., Smith H., *Biochem. J.*, **101**, 711—716 (1966).
405. Galvez G. E., *Virology*, **28**, 171—187 (1966).
406. Gander E. S., Mueller R. U., Goldenberg S., Morel C., *Mol. Biol. Rep.*, **2**, 343—349 (1975).
407. Гамелин В. Л., Сазыкин Ю. О., Разлогова Н. О., Навашин С. М., *Хим.-фарм. ж.*, **10**, № 3, 15—18 (1976).
408. Ganesan D., Bass H. B., *FEBS Lett.*, **53**, 1—4 (1975).
409. Garbers D. L., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4071—4077 (1976).
410. Garner D. L., Cullison R. F., *J. Chromatogr.*, **92**, 445—449 (1974).
411. Gaudlie J., Hillcoat B. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 35—40 (1972).
412. Geiger B., Ben-Yoseph Y., Arnon R., *FEBS Lett.*, **45**, 276—281 (1974).
413. Geisow M. J., *Biochem. J.*, **151**, 181—183 (1975).
414. Gennis L. S., Cantor C. R., *J. Biol. Chem.*, **251**, 734—740 (1976).
415. Gentry P. W., Alexander B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 500—505 (1973).
416. Geren C. R., Magee S. C., Ebner K. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 149—155 (1976).
417. Gerwin B. I., Milstien J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 2599—2603 (1972).
418. Ghetie V., Onica D., *Rev. Roum. Biochim.*, **10**, 185—189 (1973).
419. Gieln J., Aviv H., Leder P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 146—154 (1974).
420. Gijzen A. H. J., *Clin. Chim. Acta*, **66**, 77—84 (1976).
421. Gijzen A. H. J., Brombacher P. J., Janssens H. H. P., Deckers S. H. C. M., *Clin. Chim. Acta*, **58**, 177—180 (1975).
422. Gilboa E., Prives C. L., Aviv H., *Biochemistry*, **14**, 4215—4220 (1975).
423. Gilboa-Garber N., Mizrahi L., Garber N., *FEBS Lett.*, **28**, 93—95 (1972).
424. Gilham P. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4982—4985 (1964).
425. Gilham P. T., Robinson W. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4985—4989 (1964).
426. Gillam I., Blew D., Warrington R. C., Von Tiegerstrom M., Tener G. M., *Biochemistry*, **7**, 3459—3468 (1968).
427. Gillam I., Millward S., Blew D., von Tiegerstrom M., Wimmer E., Tener G. M., *Biochemistry*, **6**, 3043—3056 (1967).
428. Gillam E. B., Kitto G. B., *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**, 21—26 (1976).
429. Ginder G. D., Snyder P. G., von Beneden R. J., Woodhead A. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 567—571 (1975).
430. Givol D., Rotman M., Israel J. Med. Sci., **6**, 452—453 (1970).
431. Givol D., Weinstein Y., Gorecki M., Wilcher M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **38**, 825—830 (1970).
432. Godinot C., Julliard J. H., Gautheron D. C., *Anal. Biochem.*, **61**, 264—270 (1974).
433. Goetzi E. J., Metzger H., *Biochemistry*, **9**, 1267—1278 (1970).
434. Gordon J. A., Blumberg S., Lis H., Sharon N., *FEBS Lett.*, **24**, 193—196 (1972).
435. Gordon G. L., Doelle H. W., *Eur. J. Biochem.*, **67**, 543—555 (1976).
436. Gorecki M., Bar-Eli A., Burstein Y., Patchornik A., Chain E. B., *Biochem. J.*, **147**, 131—137 (1975).
437. Gorecki M., Bar-Eli A., Patchornik A., *Methods Enzymol.*, **34**, 398—401 (1974).

438. Gorecki M., Wilchek M., Patchornik A., *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 590—595 (1971).
439. Gospodarowicz D., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6491—6498 (1972).
440. Гурвич А. Е., Капнер П. Б., Незлин Р. С., *Биохимия*, **24**, 144—156 (1959).
441. Gozes I., Schmitt H., Littauer U. Z., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 701—705 (1975).
442. Grant D. A. W., Hermon-Taylor J., *Biochem. J.*, **147**, 363—366 (1975).
443. Grant D. A. W., Hermon-Taylor J., *Biochem. J.*, **155**, 243—254 (1976).
444. Greaves M. F., Bauminger S., *Nature New Biol.*, **235**, 67—70 (1972).
445. Grebner E. E., Parikh I., *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 437—441 (1974).
446. Green N. M., Toms E. J., *Biochem. J.*, **133**, 687—700 (1973).
447. Greenwald R. A., Schartz C. E., Cantor J. O., *Biochem. J.*, **145**, 601—605 (1975).
448. Greth M. L., Chevallier M. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 168—181 (1975).
449. Gribnau A. A. M., Schoenmakers J. G. G., van Kraaikamp M., Bloemendal H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **38**, 1064—1068 (1970).
450. Grossman H., Liefländer M., Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, **356**, 663—669 (1975).
451. Grossmann S., Trop M., Yaroni S., Wilchek M., *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 77—81 (1972).
452. Grover A. K., Hammes G. G. *Biocrim. Biophys. Acta*, **356**, 309—318 (1974).
453. Gruenwedel D. W., Fu J. C. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 2002—2005 (1971).
454. Guchhait R. B., Polakis S. E., Dimroth P., Stoll E., Moss J., Lane M. D., *J. Biol. Chem.*, **249**, 6633—6645 (1974).
455. Guesdon J. L., Avrameas S., *J. Immunol. Methods*, **11**, 129—133 (1976).
456. Guilford H., Larsson P. O., Mosbach K., *Chem. Scr.*, **2**, 165—170 (1972).
457. Guimezanes A., Fridman W. H., Gisler R. H., Kourilsky F. M., *Eur. J. Immunol.*, **6**, 69—72 (1976).
458. Guitard M., Daigneault R., *Can. J. Biochem.*, **52**, 1087—1090 (1974).
459. Gulliver P. A., Wharton C. W., *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2033—2038 (1976).
460. Radioimmunoassay of Steroid Hormones, D. Gupta (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1975, p. 224.
461. Gurd J. W., Mahler H. R., *Biochemistry*, **13**, 5193—5198 (1974).
462. Guyda H. J., Friesen H. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **42**, 1068—1075 (1971).
463. Gyenes L., Rose B., Sehon A. H., *Nature (London)*, **181**, 1465—1466 (1958).
464. Gyenes L., Sehon A. H., *Can. J. Biochem. Biophys.*, **38**, 1235—1248 (1960).
465. Gyenge L., Spiridonova V. A., Bogdanov A. A., *FEBS Lett.*, **20**, 209—210 (1972).
466. Haaijman J. J., Bloemmen F. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**, 137—150 (1975).
467. Hackenbrock C. R., Hammon K. M., *J. Biol. Chem.*, **250**, 9185—9197 (1975).
468. Hajnická V., Fuchsberger N., Borecký L., *Acta Virol.*, **20**, 326—333 (1976).
469. Hall S. H., Smuckler E. A., *Biochemistry*, **13**, 3795—3805 (1974).
470. Hammar L., Pahlman S., Hjertén S., *Biocrim. Biophys. Acta*, **403**, 554—562 (1975).
471. Hammarström S., Kabat E. A., *Biochemistry*, **8**, 2696—2705 (1969).
472. Hampl R., Táborský O., Musil J., Stárka L., *J. Chromatogr.*, **97**, 57—63 (1974).
473. Harding J. J., *J. Chromatogr.*, **77**, 191—199 (1973).
474. Harisdangkul V., Kabat E. A., McDonough R. J., Sigel M. M., *J. Immunol.*, **108**, 1244—1258 (1972).
475. Harpaz N., Flowers H. M., *Methods Enzymol.*, **34**, 347—350 (1974).
476. Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N., *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 213—221 (1974).

477. Harris R. G., Rowe J. J. M., Stewart P. S., Williams D. C., FEBS Lett., 29, 189—192 (1973).
478. Harvey M. J., Craven D. B., Lowe C. R., Dean P. D. C., Methods Enzymol., 34, 242—253 (1974).
479. Hatton M. W. C., Regoeczi E., Biochim. Biophys. Acta, 359, 55—65 (1974).
480. Hatton M. W. C., Regoeczi E., Biochim. Biophys. Acta, 379, 504—511 (1975).
481. Hatton M. W. C., Regoeczi E., Biochim. Biophys. Acta, 427, 575—585 (1976).
482. Hatton M. W. C., Regoeczi E., Biochim. Biophys. Acta, 438, 339—346 (1976).
483. Haugen T., Ishaque A., Chatterjee A. K., Preiss J., FEBS Lett., 42, 205—208 (1974).
484. Haustein D., Warr G. W., J. Immunol. Methods, 12, 323—336 (1976).
485. Hautala J. A., Jacobson J. W., Case M. E., Gilles N. H., J. Biol. Chem., 250, 6008—6014 (1975).
486. Hayashi H., J. Biochem. (Tokyo), 74, 203—208 (1973).
487. Hayes C. E., Goldstein I. J., J. Biol. Chem., 249, 1904—1914 (1974).
488. Hayman M. J., Crumpton M. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 47, 923—930 (1972).
489. Hayman M. J., Skehel J. J., Crumpton M. J., FEBS Lett., 29, 185—188 (1973).
490. Hearn M. T. W., Adams D. D., Hancock W. S., Proc. Univ. Otago Med. Sch., 53, 45—47 (1975).
491. Heene D. L., Matthias F. R., Thromb. Res., 2, 137—154 (1973).
492. Heimer Y. M., Krashin S., Riklis E., FEBS Lett., 62, 30—32 (1976).
493. Heinzel W., Rahimi-Laridjani I., Grimminger H., J. Immunol. Methods, 9, 337—344 (1976).
494. Helman M., Glvol D., Biochem. J., 125, 971—974 (1971).
495. Henderson G. B., Shaltiel S., Snell E. E., Biochemistry, 13, 4335—4338 (1974).
496. Hengartner H., Harris J. I., FEBS Lett., 55, 282—285 (1975).
497. Henry C., Kimura J., Wofsy L., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69, 34—36 (1972).
498. Hernandez R., Just M., Bürgin-Wolff A., Z. Immunoforsch., 145, 376—384 (1973).
499. Hierowski M., Brodersen R., Biochim. Biophys. Acta, 354, 121—129 (1974).
500. Hill R. J., J. Immunol. Methods, 1, 231—245 (1972).
501. Hinman N. D., Morgan J. L., Seeds N. W., Cann J. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 752—758 (1973).
502. Hirschhäuser C., Kionke M., Fert. Steril., 22, 360—366 (1971).
503. Hixon H. F., Jr., Nishikawa A. H., Arch. Biochem. Biophys., 154, 501—509 (1973).
504. Hixon H. F., Jr., Nishikawa A. H., Methods Enzymol., 34, 440—448 (1974).
505. Hjelm H., Scand. J. Immunol., 4, 633—640 (1975).
506. Hjelm H., Hjelm K., Sjöquist J., FEBS Lett., 28, 73—76 (1972).
507. Hjelm H., Sjödaht J., Sjöquist J., Eur. J. Biochem., 57, 395—403 (1975).
508. Ho M. W., FEBS Lett., 53, 243—247 (1975).
509. Ho P. P. K., Townner R. D., Prep. Biochem., 6, 215—222 (1976).
510. Hoag S., Charm S., Raam S., Immunochemistry, 12, 833—837 (1975).
511. Hochstrasser K., Ilchmann K., Werle E., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 350, 929—932 (1969).
512. Hochstrasser K., Muss M., Werle E., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 348, 1337—1340 (1967).
513. Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 353, 221—226 (1972).
514. Hochstrasser K., Werle E., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 350, 249—254 (1969).

515. Hochstrasser K., Werle E., Siegleman R., Schwarz S., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 350, 897—902 (1969).
516. Hockenfull D. J. D., Herbert D., Biochem. J., 39, 102—106 (1945).
517. Hocking J. D., Harris J. I., FEBS Lett., 34, 280—284 (1973).
518. Hoffmann P. J., Blakley R. L., Biochemistry, 14, 4804—4812 (1975).
519. Hoffmann D. R., Grossberg A. L., Pressman D., Immunochemistry, 8, 769—784 (1971).
520. Hofstee B. H. J., Anal. Biochem., 52, 430—448 (1973).
521. Hofstee B. H. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 751—757 (1973).
522. Höjeborg B., Brodelius P., Rydström J., Mosbach K., Eur. J. Biochem., 66, 467—475 (1976).
523. Hokse H., Carbohydr. Res., 37, 390—392 (1974).
524. Holbrook J., Bucher J., Penniall R., Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem., 357, 623—627 (1976).
525. Holdsworth G., Coleman R., Biochem. Soc. Trans., 3, 746—747 (1975).
526. Holguin J., Cardinaud R., Eur. J. Biochem., 54, 505—514 (1975).
527. Holleman W. H., Weiss L. J., J. Biol. Chem., 251, 1663—1669 (1976).
528. Hollunger G., Niklasson B., Croat. Chim. Acta, 47, 361—369 (1975).
529. Holmberg L., Bladh B., Astedt B., Biochim. Biophys. Acta, 445, 215—222 (1976).
530. Holmbergh O., Biochem. Z., 258, 134—140 (1933).
531. Holmquist L., Acta Chem. Scand. B, 28, 1065—1068 (1974).
532. Holohan P. D., Mahajan K., Fondy T. D., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 29, 888 (1970).
533. Holroyde M. J., Cheshier J. M. E., Trayer I. P., Walker D. G., Biochem. J., 153, 351—361 (1976).
534. Holroyde M. J., Trayer I. P., Biochem. Soc. Trans., 2, 1310—1311 (1974).
535. Höök M., Björk L., Hopwood J., Lindahl U., FEBS Lett., 66, 90—93 (1976).
536. Hopff W. H., Riggio G., Waser P. G., FEBS Lett., 35, 220—222 (1973).
537. Horesji V., Kocourek J., Biochim. Biophys. Acta, 297, 346—351 (1973).
538. Horesji V., Kocourek J., Methods Enzymol., 34, 178—181 (1974).
539. Horesji V., Kocourek J., Methods Enzymol., 34, 361—367 (1974).
540. Horitsu H., Nakashima K., Tomoyeda M., Agr. Biol. Chem., 39, 2253—2254 (1975).
541. Houwen B., Goudeau A., Dankert J., J. Immunol. Methods, 8, 185—194 (1975).
542. Houwen B., Marrink J., Vos J., Molenaar I., Nieweg H. O., Vox Sang., 24s, 114—122 (1973).
543. Howard I. K., Sage H. J., Biochemistry, 8, 2436—2441 (1969).
544. Hsu H. W., Davis D. S., Wei C. H., Yang W. K., Anal. Biochem., 73, 513—521 (1976).
545. Huang J. W., Davey M. W., Hejna C. J., von Muenchhausen W., Sulkowski E., Carter W. A., J. Biol. Chem., 249, 4665—4667 (1974).
546. Hudgin R., Pricer W. E., Jr., Ashwell G., J. Biol. Chem., 249, 5536—5543 (1974).
547. Hulla F. W., Höckel M., Risi S., Dose K., Eur. J. Biochem., 67, 469—476 (1976).
548. Hunt R. C., Bullis C. M., Brown J. C., Biochemistry, 14, 109—115 (1975).
549. Hurwitz E., Dietrich F. M., Sela M., Eur. J. Biochem., 17, 273—277 (1970).
550. Husain S. S., Mautner H. G., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 32, 564 (1973).
551. Husain S. S., Mautner H. G., Proc. Acad. Sci. U. S., 70, 3749—3753 (1973).
552. Hwaang P., Murray J. B., Jacobs J. W., Niall H. D., Friesen H., Biochemistry, 13, 2354—2358 (1974).
553. Hy M., Reeves H. C., Biochim. Biophys. Acta, 445, 280—285 (1976).
554. Ichiki A. T., Quirin Y. P., Shelton R. M., Lange R., J. Lab. Clin. Med., 86, 295—299 (1975).

555. *Ida S., Kobayakawa K., Morita Y.*, FEBS Lett., **65**, 305—308 (1976).
556. *Igarashi K., Terada K., Tango Y., Katakura K., Hirose S.*, J. Biochem. (Tokyo), **77**, 383—390 (1975).
557. *Ihle J. N., Lee K. L., Kenney F. T.*, J. Biol. Chem., **249**, 38—42 (1974).
558. *Ikeda S., Hara H., Sugimoto S., Fukui S.*, FEBS Lett., **56**, 307—311 (1975).
559. *Ikeda Y., Steiner M.*, J. Biol. Chem., **251**, 6135—6141 (1976).
560. *Imai Y., Sato R.*, J. Biochem. (Tokyo), **75**, 689—697 (1974).
561. *Imoto T., Hayashi K., Funatsu M.*, J. Biochem., **64**, 387—392 (1968).
562. *Imoto T., Yagishita K.*, Agr. Biol. Chem., **37**, 465—470 (1973).
563. *Imoto T., Yagishita K.*, Agr. Biol. Chem., **37**, 1191—1192 (1973).
564. *Inman J. K., Dintzis H. M.*, Biochemistry, **8**, 4074—4082 (1969).
565. *Inouye H., Fuchs S., Sela M., Littauer U. Z.*, J. Biol. Chem., **248**, 8125—8129 (1973).
566. *Ionescu-Stoian F., Schell H. D.*, Rev. Roum. Biochim., **10**, 113—117 (1973).
567. *Irimura T., Osawa T.*, Arch. Biochem. Biophys., **151**, 475—482 (1972).
568. *Irving R., Mainwaring W. I. P.*, J. Steroid Biochem., **5**, 711—716 (1974).
569. *Ishikawa K., Iwai K.*, J. Biochem. (Tokyo), **77**, 391—398 (1975).
570. *Ishiyama I., Uhlenbruck G.*, Z. Immunoforsch., **143**, 147—155 (1972).
571. *Isliger H. C.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **57**, 225—238 (1954).
572. *Iverius P. H., Lindahl U., Egebrud T., Olivecrona T.*, J. Biol. Chem., **247**, 6610—6616 (1972).
573. *Jackson R. J., Wolcott R. M., Shiota T.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **51**, 428—435 (1973).
574. *Jakubowski H., Pawelkiewicz J.*, FEBS Lett., **34**, 150—154 (1973).
575. *Jakubowski H., Pawelkiewicz J.*, Eur. J. Biochem., **52**, 301—310 (1975).
576. *Jakubowski H., Pawelkiewicz J.*, Biochim. Biophys. Acta, **407**, 213—221 (1975).
577. *Jalouzet R., Gontcharoff M., Briane D.*, FEBS Lett., **59**, 221—224 (1975).
578. *Jameson G. W., Elmore D. T.*, Biochem. J., **124**, 66P (1971).
579. *Jameson G. W., Elmore D. T.*, Biochem., **141**, 555—565 (1974).
580. *Jankowski W. J., Davey M. W., O'Malley J. A., Sulkowski E., Carter W. A.*, J. Virol., **1124**—1130 (1975).
581. *Janoff A.*, Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., **32**, 292 (1973).
582. *Jansen J. L. J., Koene R. A. P., von Kamp G. J., Tamboer W. P. M., Wijdeveld P. G. A.*, J. Immunol., **115**, 387—391 (1975).
588. *Jennissen H. P., Hörst W. H., Heilmeyer L. M. G., Jr.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 236—237 (1973).
584. *Jaton J. C., Kinman N. R., Givol D., Sela M.*, Biochemistry, **7**, 4185—4195 (1968).
585. *Jeffrey A. M., Zopf D. A., Ginsburg V.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **62**, 608—613 (1975).
586. *Jellum E., Edjarn L.*, Biochim. Biophys. Acta, **100**, 144—153 (1965).
587. *Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G., Jr.*, Biochemistry, **14**, 754—760 (1975).
588. *Jennissen H. P., Hörst W. H., Heilmeyer L. M. G., Jr.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 236—237 (1973).
589. *Jensen H. B., Kleppe K.*, Eur. J. Biochem., **26**, 305—312 (1972).
590. *Jergil B., Guilford H., Mosbach K.*, Biochem. J., **139**, 441—448 (1974).
591. *Jergil B., Mosbach K.*, Methods Enzymol., **34**, 261—264 (1974).
592. *Jervis L.*, Biochem. J., **127**, 29P—30P (1972).
593. *Jervis L.*, Phytochemistry, **13**, 723—727 (1974).
594. *Jervis L., Pettit N. M.*, J. Chromatogr., **97**, 33—38 (1974).
595. *Jesty S., Nemerson Y.*, J. Biol. Chem., **249**, 509—515 (1974).
596. *Jones A. S., Parsons D. G.*, Proc. Chem. Soc., 78—80 (1961).
597. *Joseph D. R., Kenney F. T., Farrelly J. G.*, Cancer Biochem. Biophys., **1**, 257—264 (1976).
598. *Jost J. P.*, Experientia, **32**, 799 (1976).
599. *Jost E., Lennox R., Harris H.*, J. Cell. Sci., **18**, 41—59 (1975).

600. Jovin T. M., Kornberg A., J. Biol. Chem., 243, 250—259 (1968).
601. Joyce C. M., Knowles J. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 60, 1278—1285 (1974).
602. Józwiak W., Kościelak J., J. Immunol., 110, 1151—1153 (1973).
603. Jung J. M., Belleau B., Mol. Pharmacol., 8, 589—593 (1972).
604. Junowicz E., Charm S. E., FEBS Lett., 57, 219—221 (1975).
605. Junowicz E., Charm S., Biochim. Biophys. Acta, 428, 157—165 (1976).
606. Junowicz E., Paris J. E., Biochim. Biophys. Acta, 321, 234—245 (1973).
607. Kahane I., Furthmayr H., Marchesi V. T., Biochim. Biophys. Acta, 426, 464—476 (1976).
608. Katderon N., Silman I., Blumberg S., Dudai Y., Biochim. Biophys. Acta, 207, 560—562 (1970).
609. Kanfer J. N., Mumford R. A., Raghavan S. S., Byrd J., Anal. Biochem., 60, 200—205 (1974).
610. Kanfer J. N., Petrovich G., Mumford R. A., Anal. Biochem., 55, 301—305 (1973).
611. Kaplan N. O., Everse J., Dixon J. W., Stolzenbach F. E., Lee C. Y., Lee C. L. T., Taylor S. S., Mosbach K., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 71, 3450—3454 (1974).
612. Kaplan M. E., Kabat E. A., J. Exp. Med., 123, 1061—1081 (1966).
613. Karlsson E., Heilbronn E., Widlund L., FEBS Lett., 28, 107—111 (1972).
614. Karlstam B., Biochim. Biophys. Acta, 329, 295—304 (1973).
615. Kasai K., Ishii S., J. Biochem. (Tokyo), 71, 363—366 (1972).
616. Kasai K., Ishii S., J. Biochem. (Tokyo), 78, 653—662 (1975).
617. Kassell B., Marchiniszyn M. B., Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors, Munich, 1970, W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971, pp. 43—46.
618. Kato J., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., 244, 5849—5855 (1969).
619. Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H., Ishikawa E., Eur. J. Biochem., 62, 285—292 (1976).
620. Kaufman B. T., Methods Enzymol., 34, 272—281 (1974).
621. Kaufman B. T., Pierce J. V., Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 608—613 (1971).
622. Kawaguchi T., Matsumoto I., Osawa T., J. Biol. Chem., 249, 2786—2792 (1974).
623. Kazarinoff M. N., Arsenis C., McCormick D. B., Methods Enzymol., 34, 300—302 (1974).
624. Keilová H., Kostka V., Collect. Czech. Chem. Comm., 40, 574—579 (1975).
625. Keilová H., Selvetová A., Kostka V., Collect. Czech. Chem. Comm., 40, 580—584 (1975).
626. Keilová H., Tomásek V., FEBS Lett., 29, 335—338 (1973).
627. Keilová H., Tomásek V., Collect. Czech. Chem. Comm., 40, 218—224 (1975).
628. Keilová H., Tomásek V., Collect. Czech. Chem. Comm., 41, 489—497 (1976).
629. Kent L. H., Slade J. H. R., Biochem. J., 77, 12—17 (1960).
630. Kenyon A. J., Gander J. E., Lopez G., Godd R. A., Science, 179, 187—189 (1973).
631. Kessler S. W., J. Immunol., 115, 1617—1624 (1975).
632. Kettner C., Rodriguez-Absi J., Glover G. I., Prescott J. M., Arch. Biochem. Biophys., 162, 56—63 (1974).
633. Kish V. M., Pederson T., J. Biol. Chem., 251, 5888—5894 (1976).
634. Kiss I., Udvardy A., Venetianer P., Acta Biochim. Biophys., 10, 177—179 (1975).
635. Kist M., Vogt A., Heinzl W., Immunochemistry, 12, 119—123 (1975).
636. Kitamura K., Okubo K., Shibasaki K., Agr. Biol. Chem., 38, 1083—1085 (1974).
637. Klein M., Mihaesco C., Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 774—778 (1973).
638. Kobayashi R., Fang V. S., Biochem. Biophys. Res. Comm., 69, 1080—1087 (1976).

639. Koerner K., Rahimi-Laridjani I., Griminger H., *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 220—230 (1975).
640. Koller F., Hoffmann-Ostenhof O., *Monatsh. Chem.*, **105**, 379—381 (1974).
641. Komiyama T., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **65**, 352—377 (1975).
642. Komoda T., Sakagishi Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 645—660 (1976).
643. Kondo H., Hayashi H., Mihashi K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **72**, 759—760 (1972).
644. Konno T., Hirai H., *J. Immunol. Methods*, **12**, 47—55 (1976).
645. Kopperschlager G., Dieze W., Freyer R., Liebe S., Hofmann E., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 40—45 (1971).
646. Korcek L., Tabachnik M., *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 323—336 (1974).
647. Kornbluth R. A., Ostro M. J., Rittmann L. S., Fondy T. P., *FEBS Lett.*, **39**, 190—194 (1974).
648. Kortt A. A., Liu T. Y., *Biochemistry*, **12**, 320—327 (1973).
649. Koshy A., Robinson D., Stirling J. L., *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 244—246 (1975).
650. Kosugi Y., Suzuki H., *J. Lipid Res.*, **17**, 307—313 (1976).
651. Kowal E. P., Markus G., *Prog. Biochem.*, **6**, 369—385 (1976).
652. Krishnaiah K. V., *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 567—575 (1975).
653. Kristiansen T., *Methods Enzymol.*, **34**, 331—341 (1974).
654. Kristiansen T., *Biochim. Biophys. Acta*, **338**, 246—253 (1974).
655. Kristiansen T., *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 567—574 (1974).
656. Kristiansen T., Einarsson M., Sundberg M., Porath J., *FEBS Lett.*, **7**, 294—296 (1970).
657. Kristiansen T., Sundberg L., Porath J., *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 93—98 (1969).
658. Krug F., Desbuguiois B., Cuatrecasas P., *Nature New Biol.*, **234**, 268—270 (1971).
659. Krusius T., *FEBS Lett.*, **66**, 86—89 (1976).
660. Krystosek A., Cawthon M. L., Kabat D., *J. Biol. Chem.*, **250**, 6077—6084 (1975).
661. Kudryk B., Reuterby J., Biombäck B., *Thromb. Res.*, **2**, 297—304 (1973).
662. Kuhn R. W., Schrader W. T., Smith R. G., O'Malley B. W., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4220—4228 (1975).
663. Kühnemund O., Köhler W., *Experientia*, **25**, 1137—1138 (1969).
664. Kula M. R., Hatef-Haghi D., Teuber-Finkelstein M., Shaltiel S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 389—396 (1976).
665. Kulick R. J., Wood H. C. S., Wigglesworth R., Ginger C. D., *Chem. Comm.*, **1975**, 464—465.
666. Kumar V., Elliot W. B., *Eur. J. Biochem.*, **34**, 586—592 (1973).
667. Kumazaki T., Kasai K., Ishii S., *J. Biochem.*, **79**, 749—755 (1976).
668. Куриненко Б. М., Шаги-Мухамедова Ф. Ф., Нужи́на А. М., *Биоорг. химия*, **1**, 1624—1632 (1975).
669. Laas T., *J. Chromatogr.*, **111**, 373—387 (1975).
670. Labavilch J. M., Freeman L. E., Albersheim P., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5904—5910 (1976).
671. Ladipo J. L., de Zoeten G. A., *Virology*, **46**, 567—574 (1971).
672. Laine R. A., Yogeewaran G., Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **249**, 4460—4466 (1974).
673. Lamed R., Levin Y., Oplatka A., *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 163—171 (1973).
674. Lamed R., Levin Y., Wilchek M., *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 231—235 (1973).
675. Lamed R., Oplatka A., *Biochemistry*, **13**, 3137—3142 (1974).
676. Lamed R., Oplatka A., Reisler E., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 688—695 (1976).

677. Lamkin G. E., King E. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., 72, 560—565 (1976).
678. Landman A. D., Dakshinamurti K., Anal. Biochem., 56, 191—195 (1975).
679. Landon J., Moffat A. C., Analyst (London), 101, 225—243 (1976).
680. Lune M. D., Edwards J., Stoll E., Moss J., Vitam. Horm., 28, 345—363 (1970).
681. Larson T. J., Hirabayashi T., Dowhan W., Biochemistry, 15, 974—979 (1976).
682. Lasch J., Iwig M., Koelsch R., David H., Marx I., Eur. J. Biochem., 60, 163—167 (1975).
683. Laurell C. B., Pierce J., Persson U., Thulin E., Eur. J. Biochem., 57, 107—113 (1975).
684. Lazarides E., Lindberg U., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 71, 4742—4746 (1974).
685. Lee T., Heitz R. L., Arch. Biochem. Biophys., 168, 35—39 (1975).
686. Lee C. Y., Kaplan N. O., Arch. Biochem. Biophys., 168, 665—676 (1975).
687. Lee C., Lappi D. A., Wermuth B., Everse J., Kaplan N. O., Arch. Biochem. Biophys., 163, 561—569 (1974).
688. Lefkowitz R. J., Haber E., O'Hara D., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69, 2828—2832 (1972).
689. LeGillard F., Racadot A., Racadot-Leroy N., Deutreuvaux M., Biochimie, 56, 99—108 (1974).
690. Le Goffic F., Andrillon-Spiegel J., Latarte R., Biochimie, 57, 29—34 (1975).
691. Le Goffic F., Baca B., Moreau N., FEBS Lett., 41, 69—72 (1974).
692. Le Goffic F., Labia R., Andrillon J., Biochim. Biophys. Acta, 315, 439—442 (1973).
693. Le Goffic F., Moreau N., FEBS Lett., 29, 289—291 (1973).
694. Le Goffic F., Moreau N., Chevereau M., Biochimie, 55, 1183—1188 (1973).
695. Legrand Y., Pignaud G., Caen J. P., Robert B., Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 224—231 (1975).
696. Lehrach H., Scheit K. H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 731 (1972).
697. Леоненко В. А., Кравченко Н. А., Черкасов И. А., Афанасьева Т., Ермольева З. В., Биохимия, 39, 1097—1102 (1974).
698. Lerman L. S., Nature (London), 172, 635—636 (1953).
699. Lerman L. S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 39, 232—236 (1953).
700. Le Vine D., Kaplan M. J., Greenway P. J., Biochem. J., 129, 847—856 (1972).
701. Levine B. B., Levytska V., J. Immunol., 102, 647—655 (1969).
702. Levine S. P., Wohl H., J. Biol. Chem., 251, 324—328 (1976).
703. Lhermitte M., Lambin G., Degand P., Roussel P., Biochimie, 57, 1293—1299 (1975).
704. Libor S., Warwick R., Sundaram T. K., FEBS Lett., 57, 34—36 (1975).
705. Lien E. L., Ellenbogen L., Law P. Y., Wood J. M., J. Biol. Chem., 249, 890—894 (1974).
706. Liener I. E., Arch. Biochem. Biophys., 121, 67—72 (1967).
707. Liener I. E., Li-pen Chao, Anal. Biochem., 25, 317—324 (1968).
708. Liener I. E., Garrison O. R., Pravda Z., Biochem. Biophys. Res. Comm., 51, 436—443 (1973).
709. Liepnies J. J., Light A., Anal. Biochem., 60, 395—404 (1974).
710. Lievaart P. A., Stevenson K. J., Can. J. Biochem., 52, 637—644 (1974).
711. Light A., Liepnies J., Methods Enzymol., 34, 448—451 (1974).
712. Lin L. J., Foster J. F., Anal. Biochem., 63, 485—490 (1975).
713. Lidberg U., Methods Enzymol., 34, 517—520 (1974).
714. Lindberg U., Eriksson S., J. Biochem., 18, 474—479 (1971).
715. Lindberg M., Larsson P. O., Mosbach K., Eur. J. Biochem., 40, 187—193 (1973).
716. Lindberg M., Mosbach K., Eur. J. Biochem., 53, 481—486 (1975).
717. Lindberg U., Persson T., Eur. J. Biochem., 31, 246—254 (1972).

718. Lindberg U., Persson T., *Methods Enzymol.*, **34**, 496—499 (1974).
719. Linder R., Salton M. R. J., Pollock J. J., *Prep. Biochem.*, **5**, 349—357 (1975).
720. Linke R. P., Sipe J. D., Pollock P. S., Ignaczak T. F., Glenner G. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 1473—1476 (1975).
721. Lis H., Lotan R., Sharon N., *Methods Enzymol.*, **34**, 341—346 (1974).
722. Lis H., Sharon N., *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 541—574 (1973).
723. Litman R. M., *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222—6233 (1968).
724. Little C., Aurebekk B., Otnaess A. B., *FEBS Lett.*, **52**, 175—179 (1975).
725. Liu T. H., Mertz E. T., *Can. J. Biochem.*, **49**, 1055—1061 (1971).
726. Livingston D. M., *Methods Enzymol.*, **34**, 723—731 (1974).
727. Livingston D. M., Scolnick E. M., Parks W. P., Todaro G. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 393—397 (1972).
728. Llorente de Carlin M. C., de Robertis E., *Life Sci.*, **19**, 903—910 (1976).
729. Lloyd K. O., *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 460—468 (1970).
730. Loeffler L. J., Hinds C. J., *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1890—1892 (1975).
731. Lönngren J., Goldstein I. J., Bywater R., *FEBS Lett.*, **68**, 31—34 (1976).
732. Lornitzo F. A., Qureshi A. A., Porter J. W., *J. Biol. Chem.*, **249**, 1654—1656 (1974).
733. Lotan R., Gussin A. E. S., Lis H., Sharon N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 656—662 (1973).
734. Lowe C. R., Dean P. D. G., *FEBS Lett.*, **14**, 313—316 (1971).
735. Lowe C. R., Dean P. D. G., *Biochem. J.*, **133**, 515—520 (1973).
736. Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Dean P. D. G., *Biochem. J.*, **133**, 499—506 (1973).
737. Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Kerfoot M. A., Hollows M. E., Dean P. D. G., *Biochem. J.*, **133**, 507—513 (1973).
738. Lowe C. R., Mosbach K., *J. Biochem.*, **49**, 511—520 (1974).
739. Ludens J. H., DeVries J. R., Fanestil D. D., *J. Steroid. Biochem.*, **3**, 193—200 (1972).
740. Ludens J. H., DeVries J. R., Fanestil D. D., *J. Biol. Chem.*, **247**, 7533—7538 (1972).
741. Lugowski C., Romanowska E., *Eur. J. Biochem.*, **48**, 81—87 (1974).
742. Lynch W. E., Surrey S., Lieberman I., *J. Biol. Chem.*, **250**, 8179—8183 (1975).
743. MacDonald I. A., Williams C. N., Mahony D. E., *Steroids*, **28**, 25—30 (1976).
744. Mach B., Faust C., Vassali P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 451—455 (1973).
745. Maciag T., Weibel M. K., Pye E. K., *Methods Enzymol.*, **34**, 451—459 (1974).
746. Madelian V., Warren W. A., *Anal. Biochem.*, **64**, 517—520 (1975).
747. Mahieu P. M., Winand R. J., *Eur. J. Biochem.*, **37**, 157—163 (1973).
748. Mahno V. C., Hayman M. J., Crumpton M. J., *Biochem. J.*, **146**, 247—252 (1975).
749. Mains R. E., Eipper B. A., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4115—4120 (1976).
750. Mainwaring W. I. P., Irving R., *Biochem. J.*, **134**, 113—127 (1973).
751. Maiolini R., Masseyeff R., *J. Immunol. Methods*, **8**, 223—234 (1975).
752. Majstovitch J., Ontjes D. A., Roberts J. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 674—679 (1974).
753. Makarewicz W., Stenkiewicz A., *Int. J. Biochem.*, **7**, 245—247 (1976).
754. Manen C.-A., Russell D. H., *Biochemistry*, **13**, 4729—4735 (1974).
755. Manen C. A., Russell D. H., *Life Sci.*, **14**, 1907—1915 (1974).
756. Mannik M., Stage D. E., *J. Immunol.*, **106**, 1670—1672 (1971).
757. Mapes C. A., Sweeley C. C., *FEBS Lett.*, **25**, 279—281 (1972).
758. Mapes C. A., Sweeley C. C., *J. Biol. Chem.*, **248**, 2461—2470 (1973).
759. Marcus S. L., *Methods Enzymol.*, **34**, 377—385 (1974).
760. Marcus S. L., *Methods Enzymol.*, **34**, 389—394 (1974).
761. Marcus S. L., Balbinder E., *Anal. Biochem.*, **48**, 448—459 (1972).
762. Marcus S. L., Modak M. J., Cavallieri L. F., *J. Virol.*, **14**, 853—859 (1974).

763. Marcus D. M., Zinberg N., Arch. Biochem. Biophys., **162**, 493—501 (1974).
764. Мардашов С. Р., Николаев А. Я., Козлов Е. А., Петрий О. П., Биохимия, **40**, 78—82 (1975).
765. Martinez-Hernandez A., Merrill D. A., Naughton M. A., Ceczy C., J. Histochem. Cytochem., **23**, 146—148 (1975).
766. Massey V., Edmondson D., Pelmer G., Beacham L. M. III, Elton G. B., Biochem. J., **127**, 10P—11P (1972).
767. Matheka H. D., Mussgay M., Arch. Ges. Virusforsch., **27**, 13—22 (1969).
768. Matsumoto I., Osawa T., Biochem. Biophys. Res. Comm., **46**, 1810—1815 (1972).
769. Matsumoto I., Osawa T., Biochemistry, **13**, 582—588 (1974).
770. Matsumoto I., Osawa T., Methods Enzymol., **34**, 329—331 (1974).
771. Matsuura A., Iwashima A., Nose Y., Biochem. Biophys. Res. Comm., **51**, 241—246 (1973).
772. Matsuura A., Iwashima A., Nose Y., Methods Enzymol., **34**, 303—304 (1974).
773. Matthews N., Rolland J. M., Nairn R. C., J. Immunol. Methods, **9**, 323—335 (1976).
774. Matthias F. R., Heene D. L., Konradi E., Thromb. Res., **3**, 657—664 (1973).
775. Matuo Y., Sano R., Tose T., Chibata I., Anal. Biochem., **68**, 349—357 (1975).
776. Matuo Y., Tose T., Chibata I., Biochim. Biophys. Acta, **338**, 520—528 (1974).
777. Matzku S., Rapp W., Biochim. Biophys. Acta, **446**, 30—30 (1976).
778. Mawal R., Morrison J. F., Ebner K., J. Biol. Chem., **246**, 7106—7109 (1971).
779. Mayhew S. G., Strating M. J. J., Eur. J. Biochem., **59**, 539—544 (1975).
780. McCormick D. B., Anal. Biochem., **13**, 194—198 (1965).
781. McGinnis J. F., de Vellis J., Biochem. Biophys. Res. Comm., **60**, 186—195 (1974).
782. McKinney R. M., Thacker Le R., Infect. Immun., **13**, 1161—1169 (1976).
783. McMenamy R. H., Oncley J. L., J. Biol. Chem., **233**, 1436—1447 (1958).
784. Mega T., Matsushima Y., J. Biochem. (Tokyo), **79**, 185—194 (1976).
785. Melcher U., Anal. Biochem., **64**, 461—465 (1975).
786. Melchers F., Messer W., Eur. J. Biochem., **17**, 267—272 (1970).
787. Melero J. A., Salas M. L., Salas J., Eur. J. Biochem., **67**, 341—348 (1976).
788. Memoli V. A., Doellgast G. J., Biochem. Biophys. Res. Comm., **66**, 1011—1016 (1975).
789. Merlie J. P., Sobel A., Changeux J. P., Gros F., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 4028—4032 (1975).
790. Merriam E. V., Dumas L. B., Sinsheimer R. L., Anal. Biochem., **36**, 389—395 (1970).
791. Miake F., Torikata T., Koga K., Hayashi K., Agr. Biol. Chem., **40**, 1269—1271 (1976).
792. Miller A. L., Frost R. G., O'Brien J. S., Anal. Biochem., **74**, 537—545 (1976).
793. Miller E., Fredholm B., Miller R. E., Steinberg D., Mayer S. E., Biochemistry, **14**, 2470—2480 (1975).
794. Miller J. V., Cuatrecasas P., Thompson E. B., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 1014—1018 (1971).
795. Miller J. V., Jr., Cuatrecasas P., Thompson E. B., Biochim. Biophys. Acta, **276**, 407—415 (1972).
796. Miller W. L., Brenner D. J., Doctor B. P., Biochim. Biophys. Acta, **366**, 188—198 (1974).
797. Minta J. O., J. Immunol., **117**, 405—412 (1976).
798. Minta J. O., Lepow J. H., J. Immunol., **111**, 286 (1973).
799. Mizon J., Corbisier P. H., Mizon-Capron C., Lagouge-Baras S., Biserte G., Biochimie, **58**, 297—304 (1976).
800. Mizon J., Mayne-d'Hautville M., Mizon-Capron C., Sautiere P., Biserte G., FEBS Lett., **47**, 125—127 (1974).
801. Morigare K., Tsuzuki H., Agr. Biol. Chem., **39**, 1123—1128 (1975).
802. Moroi M., Aoki N., J. Biol. Chem., **251**, 5956—5965 (1976).

803. *Morris S. J.*, *J. Chromatogr.*, **82**, 349—357 (1973).
804. *Morrison S. L.*, *Koshland M. E.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 124—128 (1972).
805. *Morrison W. S.*, *Wong G.*, *Seltzer S.*, *Biochemistry*, **15**, 4228—4233 (1976).
806. *Morrod P. J.*, *Marshall A. G.*, *Clark D. G.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **63**, 335—342 (1975).
807. *Mosbach K.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 229—242 (1974).
808. *Mosbach K.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 595—598 (1974).
809. *Mosbach K.*, *Guilford H.*, *Larsson P.-O.*, *Ohlsson R.*, *Scott M.*, *Biochem. J.*, **125**, 20P—21P (1971).
810. *Mosbach K.*, *Guilford H.*, *Ohlsson R.*, *Scott M.*, *Biochem. J.*, **127**, 625—631 (1972).
811. *Mosbach K.*, *Guilford H.*, *Ohlsson R.*, *Scott M.*, *Biochem. J.*, **127**, 12P—13P (1972).
812. *Мосолов В. В.*, *Федуркина Н. В.*, *Биохимия*, **39**, 624—629 (1974).
813. *Мосолов В. В.*, *Кротова Л. И.*, *Соколова Е. В.*, *ДАН СССР*, **215**, 470—473 (1974).
814. *Мосолов В. В.*, *Лушикова Е. В.*, *Биохимия*, **35**, 440—447 (1970).
815. *Moudgil N. R.*, *Porter R. R.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **71**, 185—187 (1963).
816. *Moudgil V. K.*, *Toft D. O.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 901—905 (1975).
817. *Mukai R.*, *Lida Y.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **54**, 134—139 (1973).
818. *Mukherjee A.*, *Srere P. A.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1476—1480 (1976).
819. *Murakami K.*, *Inagami T.*, *Biophys. Res. Comm.*, **62**, 757—763 (1975).
820. *Murakami K.*, *Inagami T.*, *Michalakakis A. M.*, *Cohen S.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **54**, 482—487 (1973).
821. *Muramatsu T.*, *Koide N.*, *Ceccarin C.*, *Atkinson P. H.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 4673—4679 (1976).
822. *Murayama A.*, *Raffin J. P.*, *Remy P.*, *Ebel J. P.*, *FEBS Lett.*, **53**, 23—25 (1975).
823. *Murphy R. F.*, *Buchanan K. D.*, *Elmore D. T.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 118—127 (1973).
824. *Murphy R. F.*, *Elmore D. T.*, *Buchanan K. D.*, *Biochem. J.*, **125**, 61P—62P (1971).
825. *Murphy R. F.*, *Imam A.*, *Hughes A. E.*, *McGucken M. J.*, *Buchanan K. D.*, *Conlon J. M.*, *Elmore D. T.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 87—96 (1976).
826. *Murthy R. J.*, *Hercz A.*, *FEBS Lett.*, **32**, 243—246 (1973).
827. *Myerowitz R. L.*, *Chrambach A.*, *Rodbard D.*, *Robbins J. B.*, *Anal. Biochem.*, **48**, 394—409 (1972).
828. *Myerowitz R. L.*, *Handzel Z. T.*, *Robbins J. B.*, *Clin. Chim. Acta*, **39**, 307—317 (1972).
829. *Nachbar M. S.*, *Oppenheim J. D.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 494 (1973).
830. *Nakamura H.*, *Littlefield J. W.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 179—187 (1972).
831. *Nakazoto H.*, *Edmonds M.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 3365—3367 (1972).
832. *Nardacci N. J.*, *Jones J. P.*, *Hall A. L.*, *Olson R. E.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **64**, 51—58 (1975).
833. *Neary J. T.*, *Diven W. F.*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 5585—5593 (1970).
834. *Nedkov P.*, *Bulg. Acad. Sci. Comm. Dept. Chem.*, **8**, 425—432 (1975).
835. *Незидова О. Д.*, *Кусалева Л. Л.*, *Мол. биол.*, **2**, 60—68 (1968).
836. *Neurath A. R.*, *Prince A. M.*, *Lippin A.*, *J. Gen. Virol.*, **19**, 391—395 (1973).
837. *Newell E. A.*, *Frank J. J.*, *Levy C. C.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5752—5758 (1976).
838. *Nevaldine B.*, *Kassell B.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 207—209 (1971).
839. *Newbold P. C. H.*, *Harding N. G. L.*, *Biochem. J.*, **124**, 1—12 (1971).
840. *Nexo E.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 189—192 (1975).
841. *Nicolas J. C.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 552—554 (1974).
842. *Nicolas J. C.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 555—557 (1974).

843. *Nicolas J. C., Pons M., Descomps B., Grastes de Paulet A.*, FEBS Lett., **23**, 175-179 (1972).
844. *Nicolson G. L., Blaustein J.*, Biochim. Biophys. Acta, **266**, 543-547 (1972).
845. *Nilsson K., Ghetie V., Sjöquist J.*, Eur. J. Immunol., **5**, 518-526 (1975).
846. *Nishi S., Hirai H.*, Biochim. Biophys. Acta, **278**, 293-298 (1972).
847. *Nishikawa A. H., Bailon P.*, Anal. Biochem., **68**, 274-280 (1975).
848. *Nishimura K., Hiwada K., Ueda E., Kobutu T.*, Biochim. Biophys. Acta, **445**, 158-160 (1976).
849. *Norden A. G. W., O'Brien J. S.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **56**, 193-198 (1974).
850. *Nowak T. P., Barondes S. H.*, Biochem. Biophys. Acta, **393**, 115-123 (1975).
851. *Nüsslein C., Heyden B.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**, 282-289 (1972).
852. *O'Brien T. A., Schrock H. L., Russell P., Blake R., Gennis R. B.*, Biochem. Biophys. Acta, **452**, 13-29 (1976).
853. *O'Carra P., Barry S.*, FEBS Lett., **21**, 281-285 (1972).
854. *O'Carra P., Barry S.*, Methods Enzymol., **34**, 598-605 (1974).
855. *O'Carra P., Barry S., Corcoran E.*, FEBS Lett., **43**, 163-168 (1974).
856. *Ogata S., Muramatsu T., Kobata A.*, J. Biochem. (Tokyo), **78**, 687-696 (1975).
857. *Ogburn C. A., Berg K., Paucker K.*, J. Immunol., **111**, 1206-1218 (1973).
858. *O'Hara D. S., Lefkowitz R. J.*, Methods Enzymol., **34**, 695-700 (1974).
859. *Ohlsson R., Brodelius P., Mosbach K.*, FEBS Lett., **25**, 234-238 (1972).
860. *Okurma T. B., Trammell P., Kalman S. M.*, Mol. Pharmacol., **8**, 476-480 (1972).
861. *Olesen K., Hippe E., Haber E.*, Biochim. Biophys. Acta, **243**, 66-74 (1971).
862. *Oliveros T., Egelrud T., Iverius P. H., Lindahl U.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **43**, 524-529 (1971).
863. *Olsen R. W., Meunier J. C., Changeux J. P.*, FEBS Lett., **28**, 96-100 (1972).
864. *Olsnes S., Saltvedt E.*, J. Immunol., **114**, 1743-1748 (1975).
865. *Olsnes S., Saltvedt E., Pihl A.*, J. Biol. Chem., **249**, 803-810 (1974).
866. *Olson H. O. J., Liener I. A.*, Biochemistry, **6**, 105-111 (1967).
867. *Omenn G. S., Ontjes D. A., Anfinsen C. B.*, Nature (London), **225**, 189-190 (1970).
868. *O'Neil S. P., Graves D. J., Ferguson J. I., Jr.*, J. Macromol. Sci. Chem., **7**, 1159-1166 (1973).
869. *Ong D. E., Brady R. N.*, Biochemistry, **13**, 2822-2827 (1974).
870. *Onoue K., Yagi Y., Pressmann D.*, Immunochemistry, **2**, 181-194 (1965).
871. *Ontjes D. A., Anfinsen C. B.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **64**, 428-435 (1969).
872. *Ontjes D., Anfinsen C. B.*, J. Biol. Chem., **244**, 6316-6322 (1969).
873. *Oplatka A., Lamed R., Muhrad A.*, Biochim. Biophys. Acta, **385**, 20-27 (1975).
874. *Oplatka A., Muhrad A., Lamed R.*, J. Biol. Chem., **251**, 3972-3978 (1976).
875. *Oppenheim J. D., Nachbar M. S., Salton M. R. J., Aull F.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **58**, 1127-1134 (1974).
876. *Oroszlan S., Bove D., Gilden R. V.*, Immunochemistry, **12**, 61-66 (1975).
877. *Oroszlan S., Long C. W., Gilden R. V.*, Virillogy, **72**, 523-526 (1976).
878. *Osborne W. R. A., Tashian R. E.*, Anal. Biochem., **64**, 297-303 (1975).
879. *Otsuka A. S., Price P. A.*, Anal. Biochem., **62**, 180-187 (1974).
880. *Ozawa T., Okumura M., Yagi K.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **65**, 1102-1107 (1975).
881. *Pacaud M.*, Eur. J. Biochem., **64**, 199-204 (1976).
882. *Pagé M.*, Can. J. Biochem., **51**, 1213-1215 (1973).
883. *Palacios R.*, J. Biol. Chem., **251**, 4787-4791 (1976).
884. *Palacios R., Sullivan D., Summers N. M., Kiely M. L., Schimke R. T.*, J. Biol. Chem., **248**, 540-548 (1973).

885. *Palmer W. G.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **278**, 299—304 (1972).
886. *Pandian M. R., Bahl O. P., Segal S. J.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **64**, 1199—1205 (1975).
887. *Pangburn M. K., Burstein Y., Morgan P. H., Walsh K. A., Neurath H.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **54**, 371—379 (1973).
888. *Panusz H., Barikowski J., Krzywiec A., Jousstra M., Plucienniczak A.*, *Nucl. Acid. Res.*, **1**, 1143—1151 (1974).
889. *Parikh I., Cuatrecasas P.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 610—619 (1934).
890. *Parikh I., Sice V., Nola E., Puca G. A., Cuatrecasas P.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 670—688 (1974).
891. *Parker D. C., Krause R. M., Wofsy L.*, *Immunochemistry*, **10**, 727—734 (1973).
892. *Parks J. S., Gottesman M., Shimada K., Weisberg R. A., Parlman R. L., Pastan I.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 1891—1895 (1971).
893. *Pass L., Zimmer T. L., Laland S. G.*, *Eur. J. Biochem.*, **40**, 43—48 (1973).
894. *Pastore E. J., Plante L. T., Kisliuk R. L.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 281—288 (1974).
895. *Patrick R. A., Mernitz J., Bing D. H.*, *J. Immunol.*, **111**, 296 (1973).
896. *Pernnerton R. E., Liberti P., Baglioni C.*, *Anal. Biochem.*, **66**, 18—28 (1975).
897. *Penninckx M., Simon J.-P., Wiame J.-M.*, *Eur. J. Biochem.*, **49**, 429—442 (1974).
898. *Pensky J., Marshall J. S.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 304—310 (1969).
899. *Pensky J., Marshall J. S.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 385—389 (1974).
900. *Pereire M. E. A., Kabat E. A.*, *Biochemistry*, **13**, 3184—3192 (1974).
901. *Peska S., McInnes J., Havell E. A., Vilcek J.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 3898—3901 (1975).
902. *Peters T., Taniuchi H., Anfinsen C. B., Jr.*, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2447—2451 (1973).
903. *Phillips N. C., Robinson D., Winchester B. G.*, *Biochem. J.*, **153**, 579—587 (1976).
904. *Picard J., C. R., Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, **282**, 235—237 (1976).
905. *Pirro G., Feldmann H.*, *Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1693—1701 (1975).
906. *Pitarra G. C., Charm S. E., Green S.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 607—611 (1975).
907. *Pitlick F. A.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 27—34 (1976).
908. *Pittner F., Fried W., Hoffmann-Ostenhof O.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 222—224 (1974).
909. *Plotz P. H., Berk P., Scharschmidt B. F., Gordon J. K., Vergalla J.*, *J. Clin. Invest.*, **53**, 778—785 (1974).
910. *Plummer T. H.*, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2930—2935 (1971).
911. *Poillon W. N.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **44**, 64—70 (1971).
912. *Pokorny M., Glaudemans C. P. J.*, *FEBS Lett.*, **50**, 66—69 (1975).
913. *Poonian M. S., Schlabach A. J., Weissbach A.*, *Biochemistry*, **10**, 424—427 (1971).
914. *Попова А. К., Федотова А. Р., Дворкин Г. А.*, *Биохимия*, **40**, 45—47 (1975).
915. *Porath J.*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 3, 145—166 (1972).
916. *Porath J., Sundberg L.*, *Nature New Biol.*, **238**, 261—262 (1972).
917. *Porath R. D., Riss H., Timberlake J. W., Chien S.*, *Biochemistry*, **13**, 250—256 (1974).
918. *Potuzak H., Wintersberger U.*, *BEBS Lett.*, **63**, 167—170 (1976).
919. *Poulsen K., Burton J., Haber E.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 258—262 (1975).
920. *Pradelles P., Jard S.*, *FEBS Lett.*, **26**, 189—192 (1972).
921. *Pradelles P., Morgat J. L., Fromageot P., Camier M., Bonne D., Cohen P., Bockaert J., Jard S.*, *FEBS Lett.*, **26**, 189—192 (1972).
922. *Преображенский А. А., Елизаров С. М.*, *Биоорг. хим.*, **1**, 1633—1638 (1975).

923. Преображенский А. А., Елизаров С. М., Барулина И. А., Бюорг. хим., 2, 228—236 (1976).
924. Pricer W. E., Jr., Hudgin R. L., Aswell G., Stockert R. J., Morell A. G., *Methods Enzymol.*, 34, 688—691 (1974).
925. Prieels J.-P., Poortmans J., Dolmans M., Léonis J., *Eur. J. Biochem.*, 50, 523—527 (1975).
926. Printz M. P., Gregory T. J., Lewicki J. A., Printz J. M., *Anal. Biochem.*, 73, 134—138 (1976).
927. Pryme I. F., Joner P. H., Jensen H. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36, 676—681 (1969).
928. Puca G. A., Sica V., Nota E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 71, 979—983 (1974).
929. Qureshi A. A., Kim M., Lornitzo F. A., Jenik R. A., Porter J. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64, 836—844 (1975).
930. Rafestin M. E., Oblin O., Monsigny M., *FEBS Lett.*, 40, 62—66 (1974).
931. Rahimi-Laridjani I., Grimminger H., Lingens F., *FEBS Lett.*, 30, 185—187 (1973).
932. Rainey P., Bennett E. L., Calvin M., *Prop. Biochem.*, 4, 227—241 (1974).
933. Ramadoss C. S., Luby L. J., Uyeda K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 487—494 (1976).
934. Ramseyer J., Kaslow H. R., Gill G. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59, 813—821 (1974).
935. Rase B., Barifai T., Ernster L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 172, 380—386 (1976).
936. Ratner D., *J. Mol. Biol.*, 88, 373—383 (1974).
937. Ray K. R., Reuben R., Molineux I., Gafter M., *J. Biol. Chem.*, 249, 5379—5381 (1974).
938. Reddy V. A., Rao N. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 675—683 (1976).
939. Reech G. R., Neurath H., *Biochemistry*, 11, 3947—3955 (1972).
940. Reech G. R., Walsh K. A., Hermodson M. A., Neurath H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 68, 1226—1230 (1971).
941. Reech G. R., Walsh K. A., Neurath H., *Biochemistry*, 10, 4690—4698 (1971).
942. Reimann E. M., Brostrom C. O., Corbin J. D., King C. A., Krebs E. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 42, 187—194 (1971).
943. Rejnek J., Mage R. G., Reisfeld R. A., *J. Immunol.*, 102, 638—646 (1969).
944. Remy P., Birmelé C., Ebel J. P., *FEBS Lett.*, 27, 134—138 (1972).
945. Rexová Benková L., Tibenský V., *Biochem. Biophys. Acta*, 268, 187—193 (1972).
946. Rhoads R. H., *J. Biol. Chem.*, 250, 8088—8097 (1975).
947. Rickert W. S., McBride-Warren P. A., *Can. J. Biochem.*, 54, 120—129 (1976).
948. Rickli E. E., Cuendet P. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 250, 447—451 (1971).
949. Rickwood D., *Biochim. Biophys. Acta*, 269, 47—50 (1972).
950. Reisen W., Rudikoff S., Oriol R., Potter M., *Biochemistry*, 14, 1052—1057 (1975).
951. Rimerman R. A., Hatfield G. W., *Science*, 182, 1268—1270 (1973).
952. Rindler-Ludwig R., Braunsteiner H., *Biochim. Biophys. Acta*, 379, 606—617 (1975).
953. Risteli L., Myllylä R., Kivirikko K. L., *Eur. J. Biochem.*, 67, 197—202 (1976).
954. Riuz-Carrillo A., Alfrey V. G., *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 185—191 (1973).
955. Robb R. J., Strominger J. L., Mann D. L., *J. Biol. Chem.*, 251, 5427—5428 (1976).
956. Robberson D. L., Davidson N., *Biochemistry*, 11, 533—537 (1972).
957. Robbins J. B., Haimovich I., Sala M., *Immunochimistry*, 4, 11—22 (1967).
958. Robbins J. B., Sneerson R., *Methods Enzymol.*, 34, 703—722 (1974).
959. Robert-Gero M., Waller J.-P., *Eur. J. Biochem.*, 31, 315—319 (1972).

960. *Robert-Gero M., Waller J.-P.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 506—513 (1974).
961. *Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 659—661 (1971).
962. *Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 28—35 (1972).
963. *Robinson N. C., Neurath H., Walsh K. A.*, *Biochemistry*, **12**, 414—420 (1973).
964. *Robinson D., Phillips N. C., Wincherter B.*, *FEBS Lett.*, **53**, 110—112 (1975).
965. *Robinson N. C., Tye R. W., Neurath H., Walsh K. A.*, *Biochemistry*, **10**, 2743—2747 (1971).
966. *Robinson P. J., Wheatley M. A., Janson J. C., Dunnill P., Lilly M. D.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1103—1112 (1974).
967. *Roche A. C., Schauer R., Monsigny M.*, *FEBS Lett.*, **57**, 245—249 (1975).
968. *Rogers G. T., Searle F., Bagshawe K. D.*, *Nature (London)*, **251**, 512—521 (1974).
969. *Rohde W., Lezius A. G.*, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1507—1516 (1971).
970. *Romanowska E., Lugowski C., Mulczyk M.*, *FEBS Lett.*, **66**, 82—85 (1976).
971. *Rood J. I., Wilkinson R. G.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **334**, 168—178 (1974).
972. *Röschlau P., Hess B.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 441—443 (1972).
973. *Rosen S. D., Kafka J. A., Stimpson D. L., Barondes S. H.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 2554—2557 (1973).
974. *Rosenberg J. S., McKenna P. W., Rosenberg R. D.*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 8883—8888 (1975).
975. *Rosenberry T. L., Chang H. W., Chen Y. T.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1555—1565 (1972).
976. *Rosner W., Smith R. N.*, *Biochemistry*, **14**, 4813—4820 (1975).
977. *Ross T. T., Hayes C. E., Goldstein I. J.*, *Carbohydr. Res.*, **47**, 91—97 (1976).
978. *Rossi C. A., Lucacchini A., Montali U., Ronca G.*, *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **7**, 81—89 (1975).
979. *Rossier J., Bauman A., Benda P.*, *FEBS Lett.*, **32**, 231—234 (1973).
980. *Rubinstein M., Scheckler Y., Patchornik A.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 1257—1263 (1976).
981. *Ruess K. P., Weinert M., Leiflander M.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 783—793 (1976).
982. *Ruiz-Carrillo A.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 547—552 (1974).
983. *Ruiz-Carrillo A., Allfrey V.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 185—191 (1973).
984. *Rutishauer U., d'Eustachi P., Edelman G. M.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 3894—3898 (1973).
985. *Rutishauer U., Edelman G. M.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **69**, 3774—3778 (1972).
986. *Rutishauer U., Millette C. F., Edelman G. M.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 1596—1600 (1972).
987. *Ryan E., Fottrell P. F.*, *FEBS Lett.*, **23**, 73—76 (1972).
988. *Ryan L. D., Vestling C. S.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 279—284 (1974).
989. *Ryder K. W., Jr., Hodes M. E.*, *J. Chromatogr.*, **80**, 128—132 (1973).
990. *Sabeur G., Sicard P. J., Aubel-Sadron G.*, *Biochemistry*, **13**, 3203—3207 (1974).
991. *Sage B. A., O'Connor J. D.*, *Anal. Biochem.*, **73**, 240—246 (1976).
992. *Saini P. K., Rosenberg I. H.*, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **32**, 928 (1973).
993. *Saini P. K., Rosenberg I. H.*, *J. Biol. Chem.*, **249**, 5131—5134 (1974).
994. *Sairam M. S., Clarke W. C., Chung D., Porath J., Li C. H.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 355—359 (1974).
995. *Sairam M. R., Porath J.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 190—196 (1976).
996. *Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S., Ohishi I.*, *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **27**, 161—172 (1974).
997. *Sakamoto S., Sakamoto M., Goldhaber P., Glümcher M. J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 41—50 (1975).
998. *Sakato K., Tanaka H., Misawa M.*, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 211—219 (1975).

999. Salomon R., Fuchs S., Aharonov A., Givon D., Littauer U. Z., *Biochemistry*, **14**, 4046—4050 (1975).
1000. Salter D. N., Ford J. E., Scott K. J., Andrews P., *FEBS Lett.*, **20**, 302—306 (1972).
1001. Sander E. G., McCormick D. B., Wright L. D., *J. Chromatogr.*, **21**, 419—423 (1966).
1002. Sandoval I. V., Cuantrecasas P., *Biochemistry*, **15**, 3424—3432 (1976).
1003. Sapin C., Druet P., *J. Immunol. Methods*, **12**, 355—363 (1976).
1004. Sapin C., Massez A., Contet A., Druet P., *J. Immunol. Methods*, **9**, 27—38 (1975).
1005. Saraceno H., De Robertis E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **69**, 555—561 (1976).
1006. Sato N., Cargille C. M., *Endocrinology*, **90**, 302—306 (1972).
1007. Sato S., Kimura T., Murao S., *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 415—422 (1975).
1008. Scatchard C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660—672 (1949).
1009. Schabert J. C., *J. Chromatogr.*, **73**, 253—256 (1972).
1010. Schade S. Z., Nisonoff A., *J. Immunol.*, **108**, 1295—1304 (1972).
1011. Schaller H., Nüsslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzschmann I., *Eur. J. Biochem.*, **26**, 474—481 (1972).
1012. Scharpé S. L., Cooreman W. M., Blomme W. J., Laekeman G. M., *Clin. Chem.*, **22**, 733—738 (1976).
1013. Scharschmidt B. F., Plotz P. H., Berk P. D., Waggoner J. G., Vergalla J., *Clin. Invest.*, **53**, 786—795 (1974).
1014. Schechter I., *Biochemistry*, **13**, 1875—1885 (1974).
1015. Scheiner O., Breitenbach M., *Monatsh. Chem.*, **107**, 581—586 (1976).
1016. Schell H. D., Cotariu D., Gozia O., *Rev. Roum. Biochim.*, **11**, 207—210 (1974).
1017. Schenkein I., Bystryk J. C., Uhr J. M., *J. Clin. Invest.*, **50**, 1864—1868 (1971).
1018. Schiller P. W., Schechter A. N., *Methods Enzymol.*, **34**, 513—516 (1974).
1019. Schleunig W. D., Schiessler H., Fritz H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 550—554 (1973).
1020. Schmer G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 810—814 (1972).
1021. Schmidt J., Raftery M. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 572—578 (1972).
1022. Schmidt J., Raftery M. A., *Biochemistry*, **12**, 852—856 (1973).
1023. Schmitt H., Littauer U. Z., *Methods Enzymol.*, **34**, 623—627 (1974).
1024. Schnaar R. L., Lee Y. C., *Biochemistry*, **14**, 1535—1541 (1975).
1025. Schott H., *FEBS Lett.*, **41**, 203—205 (1974).
1026. Schott H., *Chromatogr.*, **96**, 79—88 (1974).
1027. Schott H., *J. Chromatogr.*, **115**, 461—476 (1975).
1028. Schott H., Eckstein H., Bayer E., *J. Chromatogr.*, **99**, 31—34 (1974).
1029. Schott H., Rudloff E., Schmidt P., Roychoudhury R., Kössel H., *Biochemistry*, **12**, 932—938 (1973).
1030. Schrader W. P., Stacy A. R., Pollara B., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4026—4032 (1974).
1031. Schwarcz R., Fried W., Plitner F., Hoffmann-Ostenhoff O., *Monatsh. Chem.*, **105**, 445—451 (1974).
1032. Schwartz N. B., Roden L., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **32**, 560 (1973).
1033. Schwartz N. B., Roden L., *Carbohydr. Res.*, **37**, 167—180 (1974).
1034. Schweiger A., Mazur G., *FEBS Lett.*, **46**, 255—259 (1974).
1035. Schweiger A., Mazur G., *FEBS Lett.*, **54**, 39—43 (1975).
1036. Schwimmer S., Balis A. K., *J. Biol. Chem.*, **179**, 1063—1074 (1949).
1037. Schwyzer R., Frank J., *Helv. Chim. Acta*, **55**, 2678—2682 (1972).
1038. Scouten W. H., *Methods Enzymol.*, **34**, 288—294 (1974).

1039. Scouten W. H., Torok F., Gitomer W., *Biochim. Biophys. Acta*, **309**, 521—524 (1973).
1040. Seela F., *Naturforsch.*, **C**, **29C**, 521—525 (1974).
1041. Seidl D. S., Liener I. E., *J. Biol. Chem.*, **247**, 3533—3538 (1973).
1042. Sela B. A., Wang J. L., Edelman G. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 1127—1131 (1975).
1043. Sela B. A., Wang J. V., Edelman G. M., *J. Biol. Chem.*, **250**, 7535—7538 (1975).
1044. Sepulcre G., Moczar E., *J. Chromatogr.*, **75**, 114—116 (1973).
1045. Serafini-Fracassini A., Field J. M., Rodger G. W., Spina M., *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 80—86 (1975).
1046. Severin E. S., Kochetkov S. N., Nesterova M. V., Gulysev N. N., *FEBS Lett.*, **49**, 61—64 (1974).
1047. Shainoff J. R., *J. Immunol.*, **100**, 187—193 (1968).
1048. Shattiel S., *Methods Enzymol.*, **34**, 126—140 (1974).
1049. Shattiel S., Adler S. P., Purich D., Caban C., Senior P., Stadtman E. R., *Proc. Nat. Sci. U. S.*, **72**, 3397—3401 (1975).
1050. Shattiel S., Ames G., Noel K. D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 174—179 (1973).
1051. Shattiel S., Er-El Z., *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **70**, 778—781 (1973).
1052. Shattiel S., Henderson G. B., Shell E. E., *Biochemistry*, **13**, 4330—4335 (1974).
1053. Shannon L. M., Mills S. E., *Eur. J. Biochem.*, **63**, 563—568 (1976).
1054. Shaper J. H., Barker R., Hill R. L., *Anal. Biochem.*, **53**, 564—570 (1973).
1055. Shaw M. C., Kay T., Viswanathe T., *Can. J. Biochem.*, **48**, 1208—1213 (1970).
1056. Sheldon R., Jurale C., Katas J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 417—421 (1972).
1057. Shieh J. J., Tamaye R., Yasunobu K. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 229—238 (1975).
1058. Shin T. Y., Khoury G., *Biochemistry*, **15**, 487—493 (1976).
1059. Shin T. Y., Martin M. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 1697—1700 (1973).
1060. Shin T. Y., Martin M. A., *Biochemistry*, **13**, 3411—3418 (1974).
1061. Shiman R., Akino M., Kaufman S., *J. Biol. Chem.*, **246**, 1330—1340 (1971).
1062. Shimizu Y., Shimizu N., Hayashi M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 1990—1994 (1973).
1063. Shimoda T., Yonekura M., Funatsu M., *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2423—2424 (1975).
1064. Shobe C. R., Brosseau J. D., *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1147—1151 (1974).
1065. Short S. A., Kaback H. R., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4285—4290 (1975).
1066. Sica V., Nola E., Parikh I., Puca G. A., Cuatrecasas P., *Nature New Biol.*, **244**, 36—39 (1973).
1067. Сидорова Е. В., Абакумова О. Р., Скворцов Т. В., Лерман М. И., *Мол. биол.*, **7**, 533—540 (1973).
1068. Sidorova E. V., Trudolyubova M. G., Lerman M. I., *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 401—408 (1974).
1069. Siebeneich H.-U., Baker B. R., *Methods Enzymol.*, **34**, 523—528 (1974).
1070. Silink M., Reddel R., Bethel M., Rowe P. B., *J. Biol. Chem.*, **250**, 5994 (1975).
1071. Silvanovich M. P., Hill R. D., *Anal. Biochem.*, **73**, 430—433 (1976).
1072. Simmonds R. J., Yon R. J., *Biochem. J.*, **157**, 153—159 (1976).
1073. Simon E. J., *Methods Enzymol.*, **34**, 619—623 (1974).
1074. Sipe J. D., DeMaeyer-Guignard J., Fauconnier B., DeMaeyer E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **70**, 1037—1040 (1973).
1075. Sips R., *J. Chem. Phys.*, **16**, 490—495 (1948).

1076. *Sirakov L. M., Barthová J., Barth T., Ditzov S. P., Jost K., Rychlik I.*, Collect. Czech. Chem. Comm., **40**, 775—780 (1975).
1077. *Sirisinha S., Eisen H. N.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 3130—3135 (1971).
1078. *Sivakami S., Radhakrishnan A. N.*, Ind. J. Biochem. Biophys., **10**, 283—284 (1973).
1079. *Sjöberg B. M., Holmgren A.*, Biochim. Biophys. Acta, **315**, 176—180 (1973).
1080. *Slavik K., Rode W., Slaviková V.*, Biochemistry, **15**, 4222—4227 (1976).
1081. *Slavik K., Zizkooský V., Slaviková V., Fort P.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **59**, 1173—1184 (1974).
1082. *Sledge C. R., Bing D. H.*, J. Immunol., **111**, 661—666 (1973).
1083. *Slor H.*, Nucleic Acids Res., **2**, 587—593 (1975).
1084. *Sluyterman L. A. E., Wijdenenes J.*, Biochim. Biophys. Acta, **200**, 593—595 (1970).
1085. *Sluyterman L. A. A. E., Wijdenes J.*, Methods Enzymol., **34**, 544—547 (1974).
1086. *Smart J. E., Pearlstein E., Waterfield M. D.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 1316—1317 (1974).
1087. *Smith B. R.*, J. Endocrinol., **52**, 229—237 (1972).
1088. *Smith J. C., Eaton M. A. W.*, Nucleic Acids Res., **1**, 1763—1773 (1974).
1089. *Smith C. J., Kelleher P. C.*, Biochim. Biophys. Acta, **317**, 231—235 (1973).
1090. *Smith I., Smith H., Pifko S.*, Anal. Biochem., **48**, 27—32 (1972).
1091. *Smith R., Turk V.*, Eur. J. Biochem., **48**, 245—254 (1974).
1092. *Soderman D. D., Germershausen J., Katzen H. M.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **70**, 792—796 (1973).
1093. *Sodetz J. M., Brockway W. J., Castellino F. J.*, Biochemistry, **11**, 4451—4458 (1972).
1094. *Sokolovsky M.*, Eur. J. Biochem., **25**, 267 (1972).
1095. *Sokolovsky M.*, Methods Enzymol., **34**, 411—414 (1974).
1096. *Sokolovsky M., Zisapel N.*, Biochim. Biophys. Acta, **250**, 203—206 (1971).
1097. *Solling H., Wang P.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **53**, 1234—1239 (1973).
1098. *Soderson J. C., Scandalios J. G.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **63**, 239—246 (1975).
1099. *Sørensen N. B., Wang P.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **67**, 883—887 (1975).
1100. *Spangenberg P., Kleine R., Flemming C.*, Acta Biol. Med. Ger., **34**, 733—739 (1975).
1101. *Sparrow L. G., McQuada A. B.*, Biochim. Biophys. Acta, **302**, 90—94 (1973).
1102. *Spielmann H., Eibs H. G., Mentzel C.*, Experientia, **32**, 1085—1086 (1976).
1103. *Spielmann H., Erickson R. P., Epstein C. J.*, FEBS Lett., **35**, 19—23 (1973).
1104. *Spindler K.-D., Hamann A., Spindler-Barth M., Inhe A., Beckers C., Emmerich H.*, Steroids, **27**, 553—565 (1976).
1105. *Спиридонова В. А., Д'Энж А., Богданов А. А.*, Биохимия, **40**, 83—88 (1975).
1106. *Sprossler B., Lingens F.*, FEBS Lett., **6**, 232—234 (1977).
1107. *Srinivasan P. R., Ramanarayanan M., Rabbani E.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 2910—2914 (1975).
1108. *Stanislawski M., Coeur-Joly G.*, Biochimie, **54**, 203—208 (1972).
1109. *Starkenstein E.*, Biochem. Z., **24**, 210—218 (1910).
1110. *Steele R. W., Smallman B. N.*, Biochim. Biophys. Acta, **445**, 147—157 (1976).
1111. *Steers E., Jr., Cuatrecasas P.*, Methods Enzymol., **34**, 350—358 (1974).
1112. *Steers E., Cuatrecasas P., Pollard H. B.*, J. Biol. Chem., **246**, 196—200 (1971).
1113. *Stemberger A., Hörmann H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 341—348 (1975).

1114. *Stemberger A., Hörmann H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 1003—1005 (1976).
1115. *Stepanov V. M., Lavrenova G. I., Borovikova V. P., Balendins G. N.*, J. Chromatogr., **104**, 373—377 (1975).
1116. *Степанов В. М., Лавренко Г. И., Славинская М. М.*, Биохимия, **39**, 383—387 (1974).
1117. *Stephan J., Gallop R. G. C., Smith H.*, Biochem. J., **101**, 717—720 (1966).
1118. *Stepien P. P.*, Biochim. Biophys. Acta, **439**, 154—159 (1976).
1119. *Sternbach H., Engelhardt R., Lezius A. G.*, Eur. J. Biochem., **60**, 51—55 (1975).
1120. *Stevenson K. J., Laudman A.*, Can. J. Biochem., **49**, 119—126 (1971).
1121. *Stewart K. K., Doherty R. F.*, FEBS Lett., **16**, 226—228 (1971).
1122. *Stewart K. K., Doherty R. F.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **70**, 2850—2852 (1973).
1123. *Stockman D. R., Hall T. C., Ryan D. S.*, Plant. Physiol., **58**, 272—275 (1976).
1124. *Stohlman S. A., Eylar O. R., Wisseman C. L., Jr.*, J. Virol., **18**, 132—140 (1976).
1125. *Stone S. S., Williams R. R.*, Arch. Biochem. Biophys., **71**, 386—392 (1957).
1126. *Stuart W. D., DeBusk A. G.*, Arch. Biochem. Biophys., **166**, 213—222 (1975).
1127. *Suckling C. J., Sweeney J. R., Wood H. C. S.*, Chem. Comm., **1975**, 173—174.
1128. *Sulkowski E., Davey M. W., Carter W. A.*, J. Biol. Chem., **251**, 5381—5385 (1976).
1129. *Sumi H., Izumiya N., Muramatu M.*, J. Biochem. (Tokyo), **78**, 481—484 (1975).
1130. *Summariá-L., Arzadon L., Bernabe P., Robbins K. C.*, J. Biol. Chem., **247**, 4691—4702 (1972).
1131. *Summariá L., Arzadon L., Bernabe P., Robbins K. C., Barlow G. H.*, J. Biol. Chem., **248**, 2984—2991 (1973).
1132. *Summariá L., Spitz F., Arzadon L., Boreisha I. G., Robbins K. C.*, J. Biol. Chem., **251**, 3693—3699 (1976).
1133. *Sundberg L., Höglund S.*, FEBS Lett., **37**, 70—73 (1973).
1134. *Sundberg L., Porath J.*, Chromatogr., **90**, 87—98 (1974).
1135. *Sundberg L., Porath J., Aspberg K.*, Biochim. Biophys. Acta, **221**, 394—395 (1970).
1136. *Suroliá A., Ahmad A., Bachhawat B. K.*, Biochim. Biophys. Acta, **404**, 83—92 (1975).
1137. *Susz J. P., Hof H. I., Brunngraber E. G.*, FEBS Lett., **32**, 289—292 (1973).
1138. *Suzuki T., Tarahashi H.*, Methods Enzymol., **34**, 432—435 (1974).
1139. *Swan D., Aviv H., Lader P.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **69**, 1967—1971 (1972).
1140. *Swanlung P., Frigeri L.*, Biochim. Biophys. Acta, **283**, 391—394 (1972).
1141. *Swanlung P., Frigeri L.*, Methods Enzymol., **34**, 566—571 (1974).
1142. *Sweet F., Adair N. K.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **63**, 99—105 (1975).
1143. *Sweet C., Stephan J., Smith H.*, Immunochemistry, **11**, 295—304 (1974).
1144. *Sykes B. C.*, FEBS Lett., **61**, 180—185 (1976).
1145. *Syska H., Perry S. V., Trayer I. P.*, FEBS Lett., **40**, 253—257 (1974).
1146. *Tabakoff B., von Wartburg J. P.*, Biochem., Biophys. Res. Comm., **63**, 957—966 (1975).
1147. *Takahashi M., Chan W. W. C.*, Can. J. Biochem., **49**, 1015—1025 (1971).
1148. *Takahashi S., Pollak J., Seifter S.*, Biochim. Biophys. Acta, **371**, 71—75 (1974).
1149. *Takahashi T., Sugahara T., Ohsaka A.*, Biochim. Biophys. Acta, **351**, 155—171 (1974).

1150. *Takegami T., Yoshida K.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **67**, 782—789 (1975).
1151. *Takemori S., Suhara K., Hashimoto S., Hashimoto M., Sato H., Gomi T., Katagiri M.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **63**, 588—593 (1975).
1152. *Takeuchi M., Kobayashi S., Ishishima E.*, Anal. Biochem., **77**, 627—630 (1976).
1153. *Tamaki N., Ness B.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 399—415 (1975).
1154. *Taniuchi H.*, Fed., Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., **29**, 335 (1970).
1155. *Tan-Wilson A. L., Reichlin M., Noble R. W.*, Immunochemistry, **13**, 491—498 (1976).
1156. *Tarone G., Prat M., Comoglio P. M.*, Biochim. Biophys. Acta, **311**, 214—221 (1973).
1157. *Tarrab R., Pérez B., López C.*, Anal. Biochem., **65**, 26—33 (1975).
1158. *Tarrab R., Rodríguez J., Huitrón C., Palacios R., Soberón G.*, Eur. J. Biochem., **49**, 457—468 (1974).
1159. *Tate R. L., Winand R. J., Kohn L. D.*, Methods Enzymol., **34**, 692—695 (1974).
1160. *Taylor C., Cox A. J., Kernohan J. C., Cohen P.*, Eur. J. Biochem., **51**, 105—115 (1975).
1161. *Teichberg V. I., Silman I., Beitsch D. D., Resheff G.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **72**, 1383—1387 (1975).
1162. *Terao T., Osawa T.*, J. Biochem. (Tokyo), **74**, 199—201 (1973).
1163. *Terman D., Harbeck R., Hoffman A., Stewart I., Robinette J., Carr R.*, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., **34**, 976 (1975).
1164. *Terman D. S., Stewart I., Hoffmann A., Carr R., Harbeck R.*, Experientia, **30**, 1493—1494 (1974).
1165. *Terman D. S., Stewart I., Tavel A., Carr R., Harbeck R.*, FEBS Lett., **61**, 59—62 (1976).
1166. *Terman D. S., Tavel T., Petty D., Tavel A., Harbeck R., Buffaloe G., Carr R.*, J. Immunol., **116**, 1337—1341 (1976).
1167. *Ternynck T., Avrameas S.*, FEBS Lett., **23**, 24—28 (1972).
1168. *Thanner F., Palm D., Shaltiel S.*, FEBS Lett., **55**, 178—182 (1975).
1169. *Thelander L.*, Biol. Chem., **248**, 4591—4601 (1973).
1170. *Thompson E. B.*, Methods Enzymol., **34**, 294—300 (1974).
1171. *Thompson A. R.*, Biochim. Biophys. Acta, **422**, 200—209 (1976).
1172. *Thompson S. T., Cass K. H., Stellwagen E.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 669—672 (1975).
1173. *Thompson S. T., Cass R., Stellwagen E.*, Anal. Biochem., **72**, 293—296 (1976).
1174. *Thompson A. R., Davie E. W.*, Biochim. Biophys. Acta, **250**, 210—215 (1971).
1175. *Tichá M., Entlicher G., Kostir J. V., Kocourek J.*, Biochim. Biophys. Acta, **221**, 282—289 (1970).
1176. *Thachuk R.*, FEBS Lett., **52**, 66—68 (1975).
1177. *Tlaskalova H., Tuckova L., Kriváková M., Rejnek J., Coupek J.*, Immunochemistry, **12**, 801—805 (1975).
1178. *Toman M., Niedermeyer W., Mestecky J., Schrohenloher R. E., Porch S.*, Anal. Biochem., **72**, 389—399 (1976).
1179. *Tomita M., Kurokawa T., Onozaki K., Ochiki N., Osawa T., Ukita T.*, Experientia, **28**, 84—85 (1972).
1180. *Tomlinson G., Shaw M. C., Viswanathe T.*, Methods Enzymol., **34**, 415—420 (1974).
1181. *Tong J. H., Kaufman S.*, J. Biol. Chem., **250**, 4152—4158 (1975).
1182. *Toraya T., Fujimura M., Ikada S., Fukui S., Yamada H., Kumagai H.*, Biochim. Biophys. Acta, **420**, 316—322 (1976).
1183. *Tosa T., Sato T., Sano R., Yamamoto K., Matuo Y., Chibata I.*, Biochim. Biophys. Acta, **334**, 1—11 (1974).

1184. *Toth-Martinez B. L., Dinya Z., Hernádi F., J. Chromatogr., 115, 205—212 (1975).*
1185. *Trapp G. A., Seal U. S., Doe R. P., Steroids, 18, 421—432 (1971).*
1186. *Travis J., Pannell R., Clin. Chim. Acta, 49, 49—52 (1972).*
1187. *Trayer I. P., Barker R., Hill R. L., Methods Enzymol., 34, 359—360 (1974).*
1188. *Trayer I. P., Hill R. L., J. Biol. Chem., 246, 6666—6675 (1971).*
1189. *Trayer I. P., Trayer H. R., Biochem. J., 141, 775—787 (1974).*
1190. *Trayer H. R., Trayer I. P., FEBS Lett., 54, 291—296 (1975).*
1191. *Trayer I. P., Trayer H. R., Small D. A. P., Bottomley R. C., Biochem. J., 139, 609—623 (1974).*
1192. *Trépanier J. M., Seargeant L. N., Stinson R. A., Biochem. J., 155, 653—660 (1976).*
1193. *Tripatzis I., Horst H. G., Nature (London), 231, 266—267 (1971).*
1194. *Trommer W. E., Becker G., Biochim. Biophys. Acta, 422, 1—7 (1976).*
1195. *Truffa-Bachi P., Guiso N., Cohen G. N., Theze J., Burr B., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 72, 1268—1271 (1975).*
1196. *Truffa-Bachi P., Wofsy L., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 66, 685—692 (1970).*
1197. *Trump G. N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 54, 544—547 (1973).*
1198. *Truong H., Baulieu E. E., FEBS Lett., 46, 321—325 (1974).*
1199. *Truong H., Geynet C., Millett C., Soullignac O., Bucourt R., Vignau M., Torelli V., Baulieu E. E., FEBS Lett., 35, 289—294 (1973).*
1200. *Tsapis A., Rogard M., Alfsen A., Mihaesco C., Eur. J. Biochem., 64, 369—372 (1976).*
1201. *Tschesche H., Dietl T., Eur. J. Biochem., 30, 560—570 (1972).*
1202. *Tschesche H., Dietl T., Marx R., Fritz H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 483—486 (1972).*
1203. *Tsung P.-K., Sakamoto T., Weissmann G., Biochem. J., 145, 437—448 (1975).*
1204. *Tuderman L., Kuutti E. R., Kivirikko K. I., Eur. J. Biochem., 52, 9—16 (1975).*
1205. *Tuppy A., Kuchler E., Biochim. Biophys. Acta, 80, 669—671 (1964).*
1206. *Turková J., Blaha K., Valentová O., Coupek J., Seifertová A., Biochim. Biophys. Acta, 427, 586—593 (1976).*
1207. *Turková J., Hubálková M., Coupek J., Biochim. Biophys. Acta, 322, 1—9 (1973).*
1208. *Turková J., Valentová O., Čoupek J., Biochim. Biophys. Acta, 420, 309—315 (1976).*
1209. *Turková J., Vavreinová S., Kriváková M., Čoupek J., Biochim. Biophys. Acta, 386, 503—508 (1975).*
1210. *Ulevitch R. J., Jones J. M., Feldman J. D., Prep. Biochem. 4, 273—281 (1974).*
1211. *Ullman B., Perlman R. L., Biochim. Biophys. Acta, 403, 393—411 (1975).*
1212. *Uren J. R., Biochim. Biophys. Acta, 236, 67—73 (1971).*
1213. *Uriel J., Bouillon D., Dupiers M., FEBS Lett., 53, 305—308 (1975).*
1214. *Usov A. I., Miroshnikova L. I., Carbohydr. Res., 43, 204—207 (1975).*
1215. *Uyemura D., Lehman I. R., J. Biol. Chem., 251, 4078—4084 (1976).*
1216. *Vaerman J.-P., Heremans J. F., Bazin H., Beckers A., J. Immunol., 114, 265—269 (1975).*
1217. *Vahlquist A., Nilsson S. F., Peterson P. A., Eur. J. Biochem., 20, 160—168 (1971).*
1218. *Валюис Р. А., Глемжа А. А., Тракимене В. В., Биохимия 40, 890—892 (1975).*
1219. *Vanecková J., Barthová J., Barth T., Krejci I., Rychlik I., Collect. Czech. Chem. Comm., 40, 1461—1465 (1975).*
1220. *Varsano Aaron N., Ulick S., J. Biol. Chem., 247, 4939—4943 (1972).*
1221. *Vassart G., Brocas H., Lecocq R., Dumont J. E., Eur. J. Biochem., 55, 15—22 (1975).*

1222. *Venis M. A.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 1824—1827 (1971).
1223. *Venkatesan S., Nakazato H., Edmonds M.*, Nucleic Acids Res., **3**, 1925—1936 (1976).
1224. *Venter B. R., Venter J. C., Kaplan N. O.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **73**, 2013—2017 (1976).
1225. *Verina A., Giudicelli H., Boyer J.*, Biochim. Biophys. Acta, **369**, 125—128 (1974).
1226. *Vician L., Tishkoff G. H.*, Biochim. Biophys. Acta, **434**, 199—208 (1976).
1227. *Villarejo M. R., Zabin I.*, Nature New Biol., **242**, 50—52 (1973).
1228. *Virupaksha T. K., Wallenfels K.*, FEBS Lett., **40**, 287—289 (1974).
1229. *Visser J., Strating M.*, Biochim. Biophys. Acta, **384**, 69—80 (1975).
1230. *Vladutiu G. D., Carmody P. J., Rattazzi M. C.*, Prep. Biochem., **5**, 147—159 (1975).
1231. *Von der Haar B., Mueller G. C.*, Biochim. Biophys. Acta, **176**, 626—631 (1969).
1232. *Vosbeck K., Chow K. F., Awad W. M.*, Proc. Fed. Am. Socs. Exp. Biol., **32**, 504 (1973).
1233. *Vosback K. D., Chow K. F., Awad W. M.*, J. Biol. Chem., **248**, 6029—6034 (1973).
1234. *Voss H. F., Ashani Y., Wilson I. B.*, Methods Enzymol., **34**, 581—591 (1974).
1235. *Vretblad P.*, FEBS Lett., **47**, 86—89 (1974).
1236. *Vretblad P.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 1327—1328 (1974).
1237. *Vretblad P.*, Biochim. Biophys. Acta, **434**, 169—176 (1976).
1238. *Wagner M.*, Acta Biol. Med., Ger., **34**, 1429—1431 (1975).
1239. *Wakabayashi Y., Iwashima A., Nose Y.*, Biochim. Biophys. Acta, **429**, 1085—1089 (1976).
1240. *Waldman A. A., Marx G., Goldstein J.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **72**, 2352—2356 (1975).
1241. *Wallach D. F. H.*, Methods Enzymol., **34**, 171—177 (1974).
1242. *Wallach D. F. H., Kranz B., Ferber E., Fischer H.*, FEBS Lett., **21**, 29—33 (1972).
1243. *Wallin R., Prydz H.*, FEBS Lett., **51**, 191—194 (1975).
1244. *Walsh K. A., Burstein Y., Pangburn M. K.*, Methods Enzymol., **34**, 435—440 (1974).
1245. *Walsh R., Mason D. T., Tonkon M. J., Wikman-Coffelt J.*, Prep. Biochem., **6**, 177—191 (1976).
1246. *Walther P. J., Hill R. L., McKee P. A.*, J. Biol. Chem., **250**, 5926—5933 (1975).
1247. *Wang P., Banfle G.*, Biochem. Soc. Trans., **2**, 1315 (1974).
1248. *Wang H. P., Kimura T.*, J. Biol. Chem., **251**, 6068—6074 (1976).
1249. *Wang R., Sevier E. D., David G. S., Reisfeld R. A.*, J. Chromatogr., **114**, 223—226 (1975).
1250. *Warecka K., Möller H. J., Vogel H. M., Trinatzis I.*, J. Neurochem., **19**, 719—725 (1972).
1251. *Waters C. A., Murphy J. R., Hastings J. W.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **57**, 1152—1158 (1974).
1252. *Waxman S., Schreiber C.*, Biochemistry, **14**, 5422—5428 (1975).
1253. *Weatherford S. C., Weisberg L. S., Achord D. T., Apirion D.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **49**, 1307—1315 (1972).
1254. *Weaver R. F., Blatti S. P., Rutter W. J.*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **68**, 2994—2999 (1971).
1255. *Webb T., Lapresle C.*, Biochem., **91**, 24—31 (1964).
1256. *Weetall H. H.*, J. Bacteriol., **93**, 1876—1880 (1967).
1257. *Weetall H. H.*, Biochem. J., **117**, 257—261 (1970).
1258. *Weetall H. H., Weliky N.*, Nature (London), **204**, 896—897 (1964).

1259. *Weibel M. K., Doyle E. R., Humphrey A. E., Bright H. J.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 167—171 (1972).
1260. *Weinstein Y., Wilchek M., Givol D.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 694—701 (1969).
1261. *Weintraub B. D.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **39**, 83—89 (1970).
1262. *Weissbach A., Poonian M.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 463—475 (1974).
1263. *Weliky N., Weetall H. H., Gilden R. V., Campbell D. H.*, *Immunochemistry*, **1**, 219—229 (1964).
1264. *Wermuth N., Kaplan N. O.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 136—143 (1976).
1265. *Wettkam W., Mullintz K. P., Deeley R. G., Kronenberg H. M., Eldridge J. D., Meyers M., Goldberger R. F.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 3364—3368 (1975).
1266. *Whitehead J. S., Weltz M. A., Kim Y. S.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**, 777—779 (1975).
1267. *Whiteley J. M., Jackson R. G., Mell G. P., Drais J. H., Huennkens F. M.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 15—22 (1972).
1268. *Whiteley J. M., Jerkunicka I., Deits T.*, *Biochemistry*, **13**, 2044—2050 (1974).
1269. *Whitney P. L.*, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2785—2789 (1973).
1270. *Whitney P. L.*, *Anal. Biochem.*, **57**, 467—476 (1974).
1271. *Wichman A., Andersson L. O.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **372**, 218—224 (1974).
1272. *Wide L., Porath J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 257—260 (1966).
1273. *Wider de Xifra E. A., Mendiara S., Batlle A. M.*, *FEBS Lett.*, **27**, 275—278 (1972).
1274. *Widmer F., Mutus B., Murthy J. R., Snieckus V. A., Viswanatha T.*, *Life Sci.*, **17**, 1297—1302 (1975).
1275. *Wierenga R. K., Huizings J. D., Gastra W., Welling G. W., Beintema J. J.*, *FEBS Lett.*, **31**, 181—185 (1973).
1276. *Wigzell H., Anderson B.*, *J. Exp. Med.*, **129**, 23—36 (1969).
1277. *Wilchek M.*, *FEBS Lett.*, **7**, 161—163 (1970).
1278. *Wilchek M.*, *Anal. Biochem.*, **49**, 572—575 (1972).
1279. *Wilchek M.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 182—195 (1974).
1280. *Wilchek M., Bocchini V., Becker M., Givol D.*, *Biochemistry*, **10**, 2828—2834 (1971).
1281. *Wilchek M., Gorecki M.*, *Eur. J. Biochem.*, **11**, 491—494 (1969).
1282. *Wilchek M., Gorecki M.*, *FEBS Lett.*, **31**, 149—152 (1973).
1283. *Wilchek M., Gorecki M.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 492—496 (1974).
1284. *Wilchek M., Lamed R.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 475—479 (1974).
1285. *Wilchek M., Miron T.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 1—7 (1972).
1286. *Wilchek M., Salomon Y., Lowe M., Selinger Z.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 1174—1184 (1971).
1287. *Wilcoz G., Clementson K. J.*, *Methods Enzymol.*, **34**, 368—373 (1974).
1288. *Wilcox G., Clementson K. J., Santi D. V., Englesberg E.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 2145—2148 (1971).
1289. *Wilson B. J., Mallet A., Cook M. W., Mackler B. F.*, *J. Immunol.*, **106**, 402—406 (1971).
1290. *Wiman B., Wallén P.*, *Eur. J. Biochem.*, **50**, 489—494 (1977).
1291. *Winquist L., Eriksson L. C., Dallner G.*, *FEBS Lett.*, **42**, 27—31 (1974).
1292. *Wofsy L., Burr B.*, *J. Immunol.*, **103**, 380—382 (1969).
1293. *Wofsy L., Kimura J., Truffa-Bachi P.*, *J. Immunol.*, **107**, 725—729 (1971).
1294. *Wolf D. H., Hoffmann M.*, *Eur. J. Biochem.*, **45**, 269—276 (1974).
1295. *Wong K. C., Kornei L., Bezkorovainy A., Murphy B. E. P.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 133—143 (1973).
1296. *Woo S. L. C., Smith R. G., Means A. R., O'Malley B. W.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 3868—3874 (1976).
1297. *Woychik J. H., Wondolowski M. V.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 347—351 (1972).

1298. Wunderer G., Fritz H., Brummer W., Hennrich N., Orth H. D., *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1324—1327 (1974).
1299. Yalow R. S., Berson S. A., *J. Clin. Invest.*, **39**, 1157—1175 (1960).
1300. Yamada R. H., Hogenkamp H. P. C., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6266—6270 (1972).
1301. Yamamoto K. R., Alberts B. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 2105—2109 (1972).
1302. Yamamura H. I., Reichard D. W., Gardner T. L., Morrisett J. D., Broomfield C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 305—315 (1973).
1303. Yanagida M., *J. Mol. Biol.*, **87**, 317—327 (1974).
1304. Yang C. H., Srivastava P. N., *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 382—387 (1975).
1305. Yasukochi Y., Masters B. S. S., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5337—5334 (1976).
1306. Yeung K. K., Carrico R. J., *Anal. Biochem.*, **74**, 369—375 (1976).
1307. Yogo Y., Teng M., Wimmer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 1101—1109 (1974).
1308. Yokosawa H., Hanba T., Ishii S., *J. Biochem.*, **79**, 757—763 (1976).
1309. Yokoyama K., Yano O., Terao T., Osawa T., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 443—452 (1976).
1310. Yon R. J., *Biochem. J.*, **126**, 756—767 (1972).
1311. Yon R. J., *Biochem. J.*, **137**, 127—130 (1974).
1312. Yon R. J., Simmonds R. J., *Biochem. J.*, **151**, 281—290 (1975).
1313. Yoon J. W., Kenyon A. J., Good R. A., *Nature New Biol.*, **245**, 205—207 (1973).
1314. Yoshida A., *J. Chromatogr.*, **114**, 321—327 (1975).
1315. Yoshimoto T., Hayashida S., Tobitshi M., Kado K., Tsuru D., *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 253—259 (1975).
1316. Yoshimoto T., Tsuru D., *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 887—889 (1974).
1317. Young N. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 46—52 (1974).
1318. Young N. S., Curd I. G., Eastlake A., Furie B., Schechter A. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 4759—4763 (1975).
1319. Yung B. J., Trowbridge C. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **65**, 927—930 (1975).
1320. Zaidenzaig Y., Shaw W. V., *FEBS Lett.*, **62**, 266—271 (1976).
1321. Zanetta J. P., Gombos G., *FEBS Lett.*, **47**, 276—278 (1974).
1322. Zöller M., Matsku S., Rapp W., *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 708—718 (1976).
1323. Zolton R. P., Mertz E. T., *Can. J. Biochem.*, **50**, 529—537 (1972).
1324. Zolton R. P., Mertz E. T., Russell H. T., *Clin. Chem.*, **18**, 654—657 (1972).

Иммобилизованные ферменты

Методы, основанные на применении иммобилизованных биологических молекул, оказались полезными во многих областях [38]. Многочисленные примеры демонстрируют, каким образом биологически активные вещества, связанные с нерастворимыми матрицами, используются в аффинной хроматографии. Исследование ферментов, связанных с нерастворимыми матрицами, так же как и их применение, тесно связано с аффинной хроматографией. Развитие технологии иммобилизации ферментов происходило одновременно с работами в области аффинной хроматографии. Изучение иммобилизованных ферментов — один из наиболее развивающихся разделов современной энзимологии. Кроме того, иммобилизованные ферменты являются также наиболее изученными аффинными лигандами, и поэтому им посвящена отдельная глава.

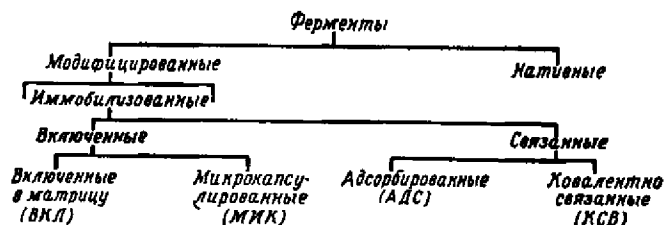
12.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

На симпозиуме по ферментной инженерии (1971 г., США) рекомендовано присвоить индивидуальные названия различным системам модифицированных ферментов [47], например термин «иммобилизованный» вместо «инсолубилизованный», «матрицированный» и т. п.

Можно выделить четыре основных класса иммобилизованных ферментов:

- 1) ферменты, иммобилизованные путем физической или химической сорбции;
- 2) ферменты, ковалентно присоединенные к растворимым или нерастворимым полимерам;
- 3) сшитые молекулы ферментов, например, подходящими бифункциональными реагентами;
- 4) ферменты, включенные в гели, мембраны или микрокапсулы.

Для классификации ферментов полезна следующая схема:



Большая часть иммобилизованных ферментных систем, хотя и необязательно все из них, соответствует этой схеме. Рекомендовано вводить символы ВКЛ, МИК, АДС и КСВ между названием носителя и фермента, характеризуя тем самым любой из четырех классов иммобилизованных ферментов. Так, например, трипсин, ковалентно связанный с карбоксиметилцеллюлозой, следует обозначать как КМ-целлюлоза-КСВ-трипсин, уреазу, включенную в капсулу из нейлона, — как нейлон-МИК-уреаза, а глюкоамилазу, включенную в полиакриламидный гель, — как акриламидный гель-ВКЛ-глюкоамилаза.

Кинетические параметры этих ферментов, а именно их активность, рекомендовано выражать для 1 г сухого препарата иммобилизованного фермента в виде начальной скорости реакции (в мкмоль/мин), измеренной в четко определенных условиях. Активность ферментов, связанных с поверхностью (например, трубок, листов и мембран), предложено относить к единице поверхности, покрытой ферментом, и выражать в виде начальной скорости реакции (в мкмоль/мин), причем скорость должна быть измерена в четко определенных условиях.

Рекомендовано также указывать:

а) условия высушивания препаратов иммобилизованных ферментов;

б) содержание белка в сухих препаратах;

в) удельную активность фермента перед иммобилизацией.

Измерение кинетических констант иммобилизованных ферментов не дает истинных констант, эквивалентных полученным в гомогенных растворах, потому что на измеряемые параметры оказывают существенное влияние физические факторы, такие как диффузия. По этой причине максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса должны рассматриваться как «кажущиеся» величины $V = V_{\text{каж}}$ и $K_m = K_{m(\text{каж})}$. $K_{m(\text{каж})}$ определяется, следовательно, как концентрация субстрата, при которой скорость реакции соответствует половине $V_{\text{каж}}$. Другие кинетические константы должны быть представлены также как соответствующие кажущиеся величины.

При обсуждении параметров, характеризующих устойчивость иммобилизованных ферментов, существенно указать все специфические условия их измерения. В заключение рекомендовано при сообщениях о новой системе для ковалентного присоединения ферментов давать следующую информацию:

- а) число реакционноспособных групп на единицу массы;
- б) максимальное число связанных небольших молекул, так же как и высокомолекулярных веществ (белков), на определенную массу носителя (полимера).

12.2. ПРИСОЕДИНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ К НЕРАСТВОРИМЫМ НОСИТЕЛЯМ И АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время наиболее распространенными методами иммобилизации ферментов являются методы ковалентного присоединения к нерастворимым носителям. Требования, предъявляемые к свойствам нерастворимых носителей, перечень этих носителей и ряд методов для присоединения белков детально обсуждаются в гл. 8. Некоторые методы, пригодные для характеристики иммобилизованных ферментов, содержатся в гл. 9. Несмотря на то что стеклянные носители редко применяются в аффинной хроматографии, они наиболее часто используются для иммобилизации ферментов; для этих целей также весьма полезными, по-видимому, могут оказаться некоторые керамические носители. Очень много данных, подкрепленных многочисленными примерами иммобилизованных ферментов, их свойств и применения, имеется в ряде обзоров и монографий [2, 15, 37, 39, 44, 57, 58].

Влияние, которое оказывают связывание и носитель, можно легко оценить для иммобилизованных ферментов на основе определения их ферментативных активностей. Наиболее часто указывается относительная активность, т. е. отношение активности 1 г сухого иммобилизованного фермента к произведению количества связанного фермента (в миллиграммах на 1 г сухого препарата) на его активность в растворе. Примеры относительной активности ферментов, связанных с носителями с помощью различных методов, а также эффективности связывания приведены в табл. 12.1 [45].

Различие в кинетических свойствах свободного и ковалентно связанного фермента обусловлено рядом факторов.

а) *Влияние диффузионных ограничений.* По аналогии с неферментативным гетерогенным катализом, где скорость диффузии реагентов в направлении активной поверхности катализатора играет важную роль в определении кинетики реакции, в катализе иммобилизованными ферментами скорость диффузии субстрата в связывающий центр фермента также в значительной степени влияет на кажущиеся кинетические параметры системы связанного фермента.

Таблица 12.1

Эффективность связывания

Пронаводное	Метод связывания	Связыва- ние, %	Относительная активность ^a , %
Сефароза— α -химотрипсин	BrCN	50	25—40
	KIO ₄	100	6
Целлюлоза—(CH ₂) ₂ —NH— α -химо- трипсин	Глутаральдегид	70	6
Полиакриламид—NH(CH ₂) ₆ —NH— — α -химотрипсин	ЭДК ^b	10	5
	BrCN	40	30
Полиакриламид—NH—(CH ₂) ₂ — —NH— α -химотрипсин	BrCN	25	8
Полиакриламид—NH—NH— α -химо- трипанн	BrCN	25	8
Полиакриламид— α -химотрипсин	NaNO ₂	40	30
Стекло—NH— α -химотрипсин	BrCN	65	35
	Глутаральдегид	100	10
Стекло—NH—трипсин	BrCN	100	22
Стекло—NH—субтилизин	BrCN	60	100
	Глутаральдегид	75	100
Сефароза—субтилизин	BrCN	90	40

^a Относительно активности свободного фермента. Активность химотрипсина и субтилизи-
на была измерена на pH-стате; в качестве субстрата использовался этиловый эфир ацетил-
тренина (pH 8), а для трипсина — этиловый эфир бензоиларгинина (pH 8).

^b ЭДК — 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид.

Поверхность нерастворимого носителя с ковалентно связанным ферментом в водной суспензии окружена перемешиваемым сло-
ем растворителя [15]. При ферментативной реакции в перемешиваемом слое перпендикулярно к нему устанавливается градиент
концентрации субстрата. Насыщение иммобилизованного фермента
происходит при концентрации субстрата, более высокой, чем это
требуется для насыщения соответствующего нативного фермента
в растворе. Это приводит к возрастанию кажущейся константы Ми-
хаэлиса $K_{m(каж)}$.

б) *Пространственные эффекты.* Ковалентное присоединение
фермента к поверхности нерастворимого носителя может привести
к стерическим ограничениям его доступности для высокомолеку-
лярных субстратов. Так, например, ковалентно присоединенные
протеолитические ферменты в большинстве случаев обладают бо-
лее высокой эстеразной относительной активностью, чем протеаз-
ной [19]. Пространственные ограничения приводят также к недо-
ступности некоторых связей в белках для протеолитического рас-
щепления иммобилизованными протеиназами, тем самым изменяя
их специфичность в отношении высокомолекулярных субстратов.
Так, например, Онг и др. [42] расщепляли пепсиноген как свобод-

ным, так и иммобилизованным трипсином (связанным с сополимером этилена и малеинового ангидрида). Оба гидролизата отличались друг от друга по их картине хроматографического разделения на сефадексе G-25 и пептидными картами индивидуальных пиков. Кроме пространственных эффектов определенную роль играет также полиэлектролитная природа иммобилизованного ферментного производного, поскольку между заряженным носителем и белковым субстратом могут осуществляться электростатические взаимодействия.

в) *Влияние химической модификации ферментов.* Ковалентное присоединение ферментов к полимерному носителю влияет на кинетическое поведение связанного фермента в результате изменения его суммарного заряда, влияния его ближайших соседей на область активного центра и изменения внутримолекулярных взаимодействий [15]. Такие же эффекты наблюдаются при химической модификации фермента низкомолекулярными реагентами. Так, например, ацетилирование и сукцинилирование химотрипсина приводят к смещению оптимума зависимости активности от pH в направлении более щелочных величин pH по сравнению с нативным химотрипсином. Однако это смещение наблюдается только при низкой ионной силе раствора и может быть устранено повышением ионной силы. Это явление, возможно, объясняется возрастанием суммарного отрицательного заряда белка в результате блокирования аминокрупп и соответствующим увеличением pK_a имидазольной группы гистидина в активном центре химотрипсина. Влияние химической модификации может быть легко объяснено для систем, в которых использовался носитель, не несущий зарядов. В случае полиэлектролитного носителя эффекты химической модификации возникают в результате значительно более сильных электростатических эффектов заряженного носителя.

г) *Влияние микроокружения.* Влияние микроокружения на кинетическое поведение иммобилизованных ферментов было изучено главным образом для ферментов, присоединенных к полиэлектролитным носителям, создающим своими зарядами электростатическое поле.

Наиболее полно исследовано влияние полианионных и поликатионных носителей на кинетические свойства протеолитических ферментов. Кроме упомянутого влияния электростатического поля полиэлектролитных носителей возникают и другие эффекты микроокружения, такие как влияние носителя на диэлектрическую проницаемость фазы иммобилизованного фермента или влияния на локальную растворимость субстратов или продуктов. Эффекты микроокружения связаны, кроме того, с ферментативной активностью, а именно в ходе катализа меняются локальные концентрации субстрата, продукта, протонов, эффекторов и т. д. Ряд примеров такого рода исследований приведен ниже.

Каким образом могут влиять на активность ферментов некоторые свойства носителей или тип присоединения фермента и насколько сильно это влияние, показано ниже на нескольких примерах. Один из наиболее важных факторов — состав реакционноспособных групп. Датта и Оллис [10] исследовали зависимость удельной активности иммобилизованного α -химотрипсина от концентрации гидразидных групп на поверхности гранул биогеля Р-2 (рис. 12.1). Обнаружено, что

кривая зависимости имеет острый максимум. На химотрипсине, лизоциме и липазе изучались изменения удельной активности не только после их иммобилизации, но одновременно и после обработки растворимыми аналогами носителей с теми же химическими группами, которые использовались для связывания белка с поверхностью носителя. Во всех случаях наблюдалась корреляция поведения модифицированных ферментов в растворимом состоянии и в иммобилизованном виде. Манеке и Фогт [33] исследовали количество папаина, связанного с носителями на основе поливинилового спирта, в зависимости от концентрации на носителе реакционноспособных диазотиевых групп. Как следует из табл. 12.2, с возра-

станием количества реакционноспособных групп носителя количество связанного папаина проходит через максимум, в то время как относительная активность постепенно понижается. Одной из причин такого уменьшения активности может быть неблагоприятное влияние многоточечного присоединения молекул фермента к носителю, который содержит избыток реакционноспособных групп. Подобные результаты были получены также с иммобилизованным пепсином [53]. Препараты, содержащие 13 мг связанного пепсина на 1 г сухого носителя, имели относительную протеолитическую активность 92,8%, содержащие 46,8 мг/г — 65,7%, 50,8 мг/г — 45,3%, а 65 мг/г — 37,8%.

Природа носителя и тип присоединения фермента влияют, однако, не только на активность, но в значительной степени также

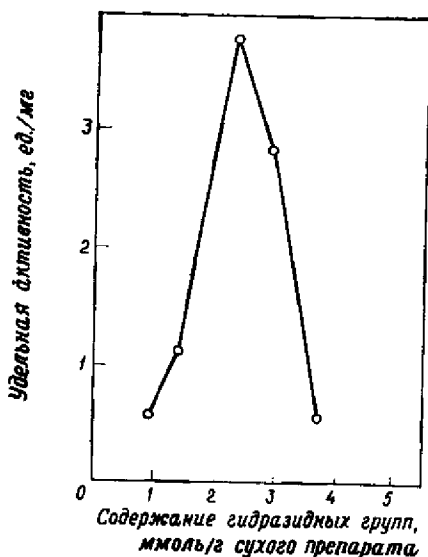


Рис. 12.1. Зависимость удельной активности иммобилизованного α -химотрипсина от концентрации поверхностных гидразидных групп на гранулах биогеля Р-2 [10].

Таблица 12.2

Зависимость количества связанного папаина от содержания реакционноспособных групп носителя, приготовленного из поливинилового спирта, сшитого 5%-ным терефталевым альдегидом и 2-(*m*-аминофенил)-1,3-диоксоланом

Число групп, ммоль/л	Количество связанного папаина ^а , мг/г	Относительная активность иммобилизованного папаина ^б , %
1,8	615	7,7
1,6	635	9,5
1,4	685	12,0
1,1	335	14,8
0,6	310	20,8
0,3	300	21,5

^а Условия сочетания: 1 М NaHCO₃, 4 °С, 15 ч.

^б Субстрат: этиловый эфир бензоил-L-аргинина, 0,05 М, рН 6,0, 30 °С.

на такие свойства, как, например, зависимость активности от температуры и рН. Влияние носителя на оптимальную температуру катализируемого трипсином гидролиза казеина хорошо видно на рис. 12.2 [5]. Если для свободного трипсина оптимальная температура <40 °С, то для трипсина, связанного с сополимером этилена и малеинового ангидрида, она несколько <60 °С, а для трипсина, связанного с КМ-целлюлозой, >70 °С.

Влияние ионизирующих групп носителя на зависимость активности от рН для свободного химотрипсина, его полианионного производного (химотрипсина, связанного с сополимером этилена и малеинового ангидрида) и его поликатионного производного (химотрипсина, связанного с полиорнитином) представлено на рис. 12.3 [17]. Активность фермента определялась по гидролизу этилового эфира N-ацетил-L-тирозина при низкой ионной силе раствора. В этом случае очень важна информация об ионной силе, поскольку изменение активности с изменением рН у химотрипсина, трипсина и его производных зависит от ионной силы [18]. Сдвиг оптимума рН эстеразной активности в зависимости от заряда носителя рассчитан также и теоретически по уравнению

$$\Delta \text{pH} = \text{pH}^i - \text{pH}^0 = 0,43ze\psi/kT, \quad (12.1)$$

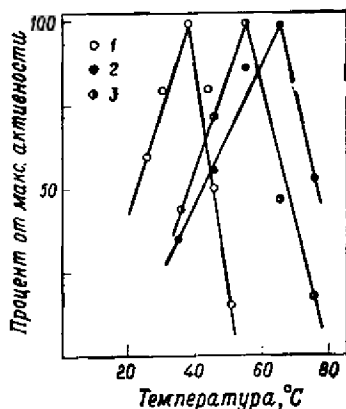
где ΔpH — разность между локальным рН в фазе полиэлектролит — фермент (pH^i) и рН внешнего раствора (pH^0), ψ — электростатический потенциал вблизи частицы заряженного иммобилизованного фермента, z — заряд на протоне, e — валентность (для ионов водорода равна 1), k — константа Больцмана, а T — абсолютная температура. Теоретические расчеты на основе этого уравнения хорошо согласуются с экспериментальными результатами. Описанные феномены относятся к эффектам, индуцируемым заря-

женным носителем. Они ведут к неравномерному распределению водородных и гидроксильных ионов между полиэлектролитной «фазой иммобилизованного фермента» и внешним раствором, вызывая более низкий «локальный pH» вблизи анионного производного фермента и более высокий «локальный pH» в микроокружении катионного производного фермента [16].

Из уравнения (12.1) следует, что присоединение фермента к нейтральному носителю не должно приводить к сдвигу pH. Дей-

Рис. 12.2. Температурные зависимости гидролиза казеина свободным и связанным трипсином (быка) [5].

Реакционные смеси содержали 10 мкг свободного или 100 мкг связанного на носителе трипсина в 1,6 мл фосфатного буфера (pH 7,5). 1 — свободный трипсин; 2 — трипсин, связанный с КМ-целлюлозой; 3 — трипсин, связанный с малеиновым сополимером.



ствительно, кривые зависимости протеолитической активности химотрипсина от pH и для свободного фермента, и для связанного с оксикалкиметакрилатным гелем, например, имеют одинаковые оптимумы [51]. Однако это не так в отношении эстеразной активности этого же фермента. Если в качестве субстрата использовать этиловый эфир ацетилтирозина, наблюдается сдвиг оптимума pH в направлении более высоких значений (в щелочную область) даже с химотрипсином, связанным с этим нейтральным носителем. Такие же результаты получены Аксеном и Эрибеком [1], исследовавшими химотрипсин, связанный с сефадексом и сефарозой. Показано, что сдвиг оптимума pH в этом случае только кажущийся и обусловлен накоплением продукта расщепления — ацетилтирозина вблизи поверхности геля, вследствие чего и наблюдаются различия в значениях pH вблизи поверхности геля и окружающего раствора. Следовательно, сдвиг оптимума pH только кажущийся; это подтверждено с помощью внутреннего индикатора, причем сдвиг зависит, очевидно, от количества связанного фермента.

Конечный и Сланицка [30, 31], кроме того, показали, что в отличие от свободного фермента активность иммобилизованного зависит также от концентрации буфера, а кривая зависимости активности от pH для иммобилизованного фермента при данной кон-

центрации буфера в значительной мере зависит от pK буфера. На рис. 12.4 показана зависимость активности эстеразы из *Bacillus subtilis*, присоединенной с помощью глутарового альдегида к алкиламину на пористом стекле CPG-550, покрытом двуокисью циркония, от pH различных буферных систем, а для фосфатного буфера

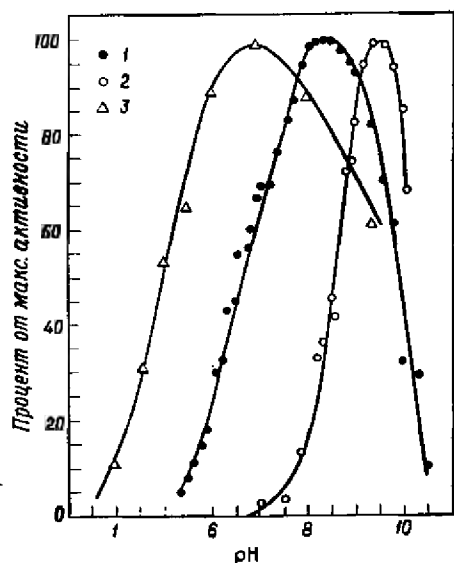


Рис. 12.3. Зависимость от pH при низкой ионной силе ($\Gamma/2=0,001$) активности химотрипсина (1), полианионного производного химотрипсина на сополимере этилена с малеиновой кислотой (2) и поликатионного производного химотрипсина с поли-L-орнитином (3), определенной по гидролизу этилового эфира N-ацетил-L-тирозина [17].

также и от концентрации этого буфера. Полученные результаты детально обсуждены с привлечением уравнений Энгассера и Хорвата [11]; выведены простые уравнения для внутреннего pH (или внутреннего градиента pH). Изменения внутреннего pH , как правило, зависят от внешнего pH , концентрации буфера и его pK ; последний фактор весьма сильно влияет на определяемые значения $K_{m(каж)}$.

Для того чтобы отличить влияние химической природы носителя и пространственные и диффузионные эффекты, Свенсон [48] приготовил одинаковые растворимые и нерастворимые производные субтилизина, связывая фермент с бромцианактивированным ДЭАЭ-декстраном и ДЭАЭ-сефадексом. Как видно из данных, приведенных в табл. 12.3, ДЭАЭ-декстран—субтилизин имеет тот же оптимум pH и K_m для гидролиза эфира, что и субтилизин. Напротив, кривая pH -зависимости, полученная для ДЭАЭ-сефадекса—субтилизина обнаруживает сдвиг в щелочную область pH и возрастание $K_{m(каж)}$. В табл. 12.3 приведены также константы скорости $k_{кат}$ уменьшающиеся при модификации фермента. Модификация, но в значительно большей степени иммобилизация приводят к значительному снижению активности субтилизина по

высокомолекулярному субстрату — казеину. В то время как активность свободного субтилизина >400 мкмоль освобождающегося H^+ в минуту на 1 мкмоль фермента, после присоединения субти-

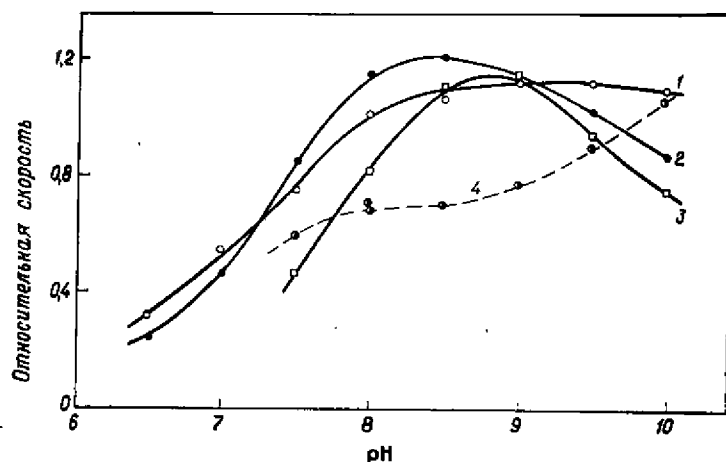


Рис. 12.4. Зависимость от pH активности связанной со стеклом эстеразы из *Bacillus subtilis* в 10 мМ фосфате (1), тристе (2), борате (3) и 2 мМ фосфате (4) [30].

лизина к ДЭАЭ-декстрану активность снижалась до <200 , а после присоединения к ДЭАЭ-сефадексу — даже до 20.

Для того чтобы исследовать влияния заряженной среды на свойства иммобилизованных протеиназ, Гольдштейн [16] приго-

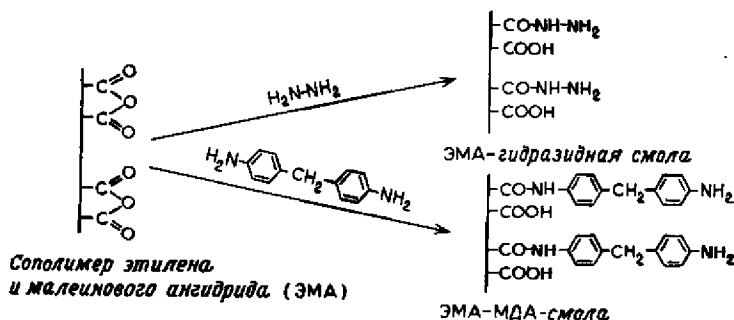
Таблица 12.3

Кинетические параметры гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина ДЭАЭ-декстран — субтилизином, ДЭАЭ-сефадекс — субтилизином и субтилизином при различной ионной силе раствора^a

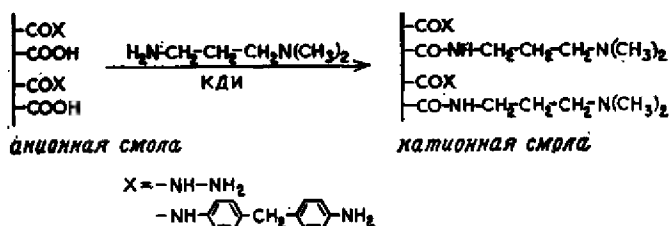
Фермент	Ионная сила	Оптимум pH	K_m или $K_{m(каж)}$, ммоль/л	$k_{кат}$, с ⁻¹
ДЭАЭ-декстран—субтилизин	1,0	8,4	33	470
	0,125	8,0	38	320
	1,0	8,5	26	880
Субтилизин	0,125	8,2	35	520
	1,0	9,0	110	210
	0,125	9,0	105	150

^a Кинетические параметры были рассчитаны с использованием линейной регрессии из графиков Лайнуивера — Берка для данных, полученных при соответствующих оптимумах pH и для концентраций эфира от 0,0025 до 0,025 моль/л. Ионная сила раствора доводилась доведением KCl.

товил гидрофильные анионный и катионный носители. Гидразин или *p,p'*-диаминодифенилметан (МДА) присоединялся к сополимеру этилена и малеинового ангидрида (ЭМА):



Из анионных полимеров — ЭМА-гидразидной и ЭМА-МДА-смола — получены катионные полимеры путем присоединения к карбоксильным группам *N,N*-диметил-1,3-пропандиамина в присутствии дициклогексилкарбодиимида (КДИ):



После превращения катионных и анионных носителей в полимерные соли диазония или ацилазиды к полимерам присоединялись трипсин, химотрипсин, субтилизин Ново, субтилизин Карлсберга и папаин. Имобилизация всех ферментов повлекла за собой сдвиг оптимума рН в щелочную область, однако эти сдвиги были на самом деле одинаковыми и для анионных и для катионных носителей и не зависели от ионной силы среды. Для объяснения полученных данных недостаточно электростатической модели и следует принять в рассмотрение другие влияния, главным образом присутствие субстрата.

После очень кратковременного контакта при связывании трипсина с оксикалкиметакрилатным гелем (4 мг связанного фермента на 1 г сухого геля) получали различное микроокружение фермента путем блокирования остающихся реакционноспособных групп глицином, этаноламином или этилендиамином [52]. Ни в одном случае не наблюдался сдвиг оптимума рН для активности, определен-

Таблица 12.4

Константы Михаэлиса нативного и иммобилизованного трипсина^a

Количество связанного трипсина, мг/г	$K_{m(\text{каж})}$, ммоль/л
86,5	0,3
273	1,4
321	1,7
400	3,1
Нативный трипсин	2,7

^a Носитель: поливиниловый спирт с 5% поперечных сшивок, 1,4 ммоль/г реакционноспособных групп. Субстрат: *п*-нитроанилид бензоиларгинина, pH 7,8, 25 °C.

ной по данным гидролиза *п*-нитроанилида бензоил-D,L-аргинина; $K_{m(\text{каж})}$, определенные для того же субстрата для иммобилизованного трипсина после обработки глицином, этаноламином или этилендиамином, составляли соответственно $1,11 \cdot 10^{-3}$; $0,91 \cdot 10^{-3}$ и $2,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, что сопоставимо с $K_m = 0,93 \cdot 10^{-3}$ моль/л для нативного трипсина.

При определении $K_{m(\text{каж})}$ следует принимать во внимание существенную зависимость от количества иммобилизованного фермента, как это следует из табл. 12.4, где приведены константы Михаэлиса для нативного трипсина и трипсина, связанного в различных количествах с поливиниловым спиртом [33, 34].

Влияние на ферментативную активность гидрофобности носителя исследовано Йохансоном и Мосбахом [26]. На матрицах с различной степенью гидрофобности (полученных с использованием сополимера акриламид—метилметакрилат) была иммобилизована алкогольдегидрогеназа. $K_{m(\text{каж})}$ для *н*-бутанола в качестве субстрата смещались в сторону более низких значений пропорционально возрастанию гидрофобного характера препаратов сополимера, с которым фермент был связан.

12.3. СТАБИЛЬНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Как и активность иммобилизованных ферментов, их стабильность также в значительной степени зависят не только от свойств самого фермента, но и от природы носителя и типа связи между ферментом и матрицей. Вообще говоря, можно утверждать, что носители, содержащие гидрофобные группы, могут денатурировать белки, аналогично тому, например, как происходит денатурация гидрофобными растворителями. Однако близость гидрофобного носителя не обязательно немедленно приведет фермент к денатурации; последний может медленно инактивироваться во время хранения или обладать повышенной чувствительностью к нагреванию,

изменению pH или денатурирующим агентам. Положительный или отрицательный заряд на гидрофильном носителе может увеличивать или уменьшать стабильность присоединенного фермента в результате электростатических взаимодействий между белком и носителем. Ковалентные связи протеолитических ферментов с носителем в большинстве случаев существенно повышают их стабильность, потому что предотвращают взаимодействие между индивидуальными молекулами, и, следовательно, автолиз.

12.3.1. Устойчивость при хранении

В обзоре Гольдмана и др. [15] описан ряд ферментов, которые не теряли свою активность при хранении при 4°C в течение нескольких месяцев, будучи связанными с сополимером этилена и малеинового ангидрида или с КМ-целлюлозой или сефарозой. Лиофильно высушенные препараты этих иммобилизованных ферментов сохраняли свою активность при продолжительном хранении не только при 4°C, но также и при комнатной температуре. Ферменты, связанные с *n*-аминобензилцеллюлозой, сополимером лейцина и *n*-аминофенилаланином или производным крахмала — днальдегид-крахмал-метилендианилином (разд. 8.2.2), могут также сохраняться на холоду в течение нескольких месяцев. Однако они почти полностью инактивируются при лиофилизации или высушивании на воздухе, возможно из-за гидрофобной природы носителя. Ферменты, присоединенные к сополимеру метакриловой кислоты и фторанилида метакриловой кислоты, обычно теряют свою активность при хранении в течение нескольких недель при 4°C.

Гольдштейн [16] исследовал стабильность нескольких иммобилизованных протеиназ. Водные суспензии анионных производных ЭМА—МДА (см. разд. 12.2) химотрипсина, субтилизина Карлсберга и субтилизина Ново незначительно теряют свою активность при хранении при 4°C в течение 3—4 месяцев. Суспензии ЭМА—МДА производных папаина и трипсина могут сохраняться в этих условиях до 8 месяцев без потери активности. Соответствующие ка-

Таблица 12.5

Сохранение ферментативной активности при лиофилизации (в %)

Фермент	ЭМА—МДА		ЭМА-гидразидные производные	
	анионное	катионное	анионное	катионное
Трипсин	76	46	100	93
Химотрипсин	30	8	50	91
Субтилизин Ново	60	5	70	98
Субтилизин Карлсберга	27	22	70	86

тионные производные ЭМА—МДА теряют 20—30% своей активности в идентичных условиях хранения. ЭМА-гидразидные производные, как анионные, так и катионные, всех этих пяти ферментов показывают высокую устойчивость при хранении. Даже после 1 года хранения при 4°C в присутствии бактерицидных агентов суспензия не теряет свою активность.

Сохранение ферментативной активности различных ЭМА—МДА и ЭМА-гидразидных производных после их лиофилизации показано в табл. 12.5. При хранении лиофилизованных порошков иммобилизованных ферментов при 25°C в течение 1 года в эксикаторе не наблюдалось никакого изменения активности.

12.3.2. Зависимость устойчивости от pH

Влияние pH на устойчивость анионных и катионных ЭМА-гидразидных производных химотрипсина, трипсина и субтилизина Ново при инкубации при 37°C в течение 30 мин показано на рис. 12.5. По сравнению с соответствующими нативными ферментами все анионные ЭМА-гидразидные, так же как и не показанные на рисунке анионные ЭМА—МДА-производные, демонстрируют повышенную устойчивость при щелочных pH. Повышение устойчивости в кислой области наблюдалось для катионных ЭМА-гидразидных и ЭМА—МДА-производных. Изменение картин для зависимостей устойчивости от pH может быть объяснено влиянием локального pH, создаваемого в результате перераспределения водородных и гидроксильных ионов вблизи иммобилизованных полиэлектролитных производных фермента.

12.3.3. Термическая устойчивость

Термостабильность анионных и катионных ЭМА—МДА- и ЭМА-гидразидных производных показана на рис. 12.6. Все анионные ЭМА-гидразидные производные более устойчивы, чем соответствующие нативные ферменты. Анионные ЭМА—МДА-производные всегда менее устойчивы, чем соответствующие ЭМА-гидразидные производные. Во всех случаях было обнаружено уменьшение термостабильности катионных производных в противоположность анионным аналогам. Катионные ЭМА—МДА-производные менее термостабильны, чем нативные ферменты. Эти результаты согласуются с общим представлением о влиянии химической природы различных нерастворимых носителей. ЭМА—МДА-смолы содержат объемные ароматические группы (разд. 12.2), и поэтому они более гидрофобны, чем соответствующие ЭМА-гидразидные смолы. Тем самым экспериментально доказано, что термостабильность и устойчивость к лиофилизации для многих иммобилизованных ферментов качественно зависят от химической природы нерастворимого носи-

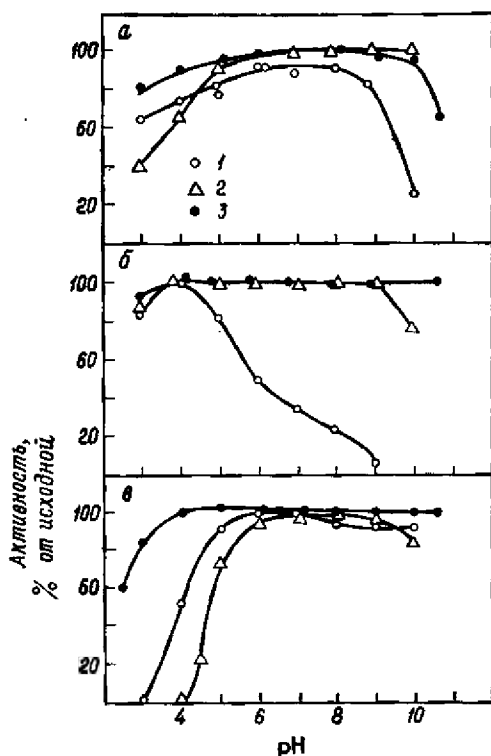


Рис. 12.5. Влияние pH на стабильность анионных и катионных ЭМА-гидразид-производных химотрипсина (а), трипсина (б) и субтилизина Ново (в) [16]. 1 — нативный фермент; 2 — анионное производное ЭМА-гидразида; 3 — катионное производное ЭМА-гидразида. Испытуемые растворы (0,5 мл) в подходящем буфере, содержащие фермент или иммобилизованное производное фермента (около 15 эстеразных единиц в 1 мл), инкубировали при 37 °С в течение 30 мин; отбирали аликвоты по 0,1 мл и определяли в них стандартным методом остаточную эстеразную активность. Использовали следующие буферные растворы: pH 3,0, 0,05 М цитрат; pH 4–5, 0,1 М ацетат; pH 6–9, 0,05 М фосфат; pH 10–10,7, 0,05 М карбонат.

теля. Даже понижение термостабильности катионных производных может быть обусловлено наличием дополнительных гидрофобных остатков — $(\text{CH}_2)_3$ -боковых цепей и концевых диметиламинных групп. Понижение термостабильности при иммобилизации фермента можно объяснить уменьшением из-за модифицирования фермента вероятности возвращения его в нативную конформацию после теплового нарушения исходной структуры.

12.3.4. Устойчивость к денатурирующим агентам

Иммобилизованные ферменты часто проявляют повышенную устойчивость к денатурирующим агентам. На рис. 12.7 показан ход необратимой денатурации нативного и иммобилизованного хи-

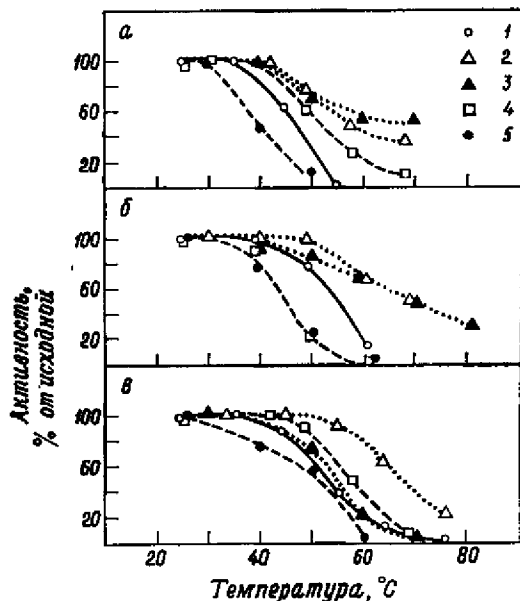


Рис. 12.6. Температурная стабильность химотрипсина (а), трипсина (б) и субтилизина Ново (в) и их анионных и катионных ЭМА—МДА- и ЭМА-гидразидных производных [16].

1 — нативный фермент; 2 — анионное производное ЭМА-гидразида; 3 — катионное производное ЭМА-МДА. Испытуемые образцы (0,5 мл), содержащие фермент или иммобилизованное производное фермента (~15 эстеразных единиц в 1 мл), в буфере с pH оптимальной устойчивости (см. рис. 12,5) инкубировали при данных температурах в течение 15 мин; отбирали аликвоты по 0,1 мл и определяли в них стандартным методом остаточную активность при 25 °C.

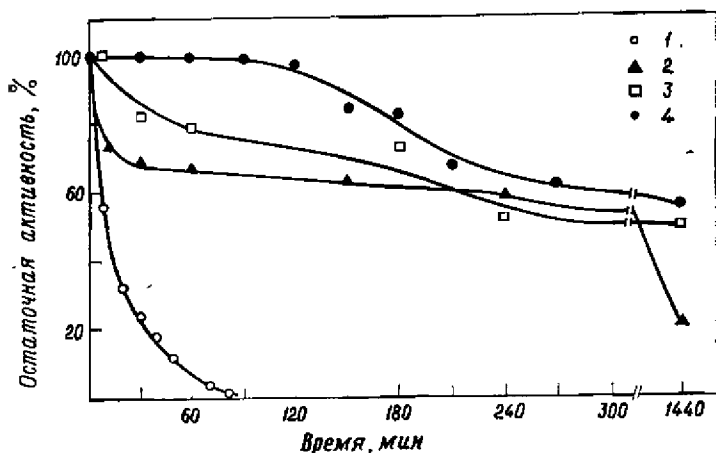


Рис. 12.7. Необратимая денатурация производных химотрипсина в 6 М мочеvine, 0,1 М фосфатном буфере (pH 8) при 25 °C [45].

1 — нативный фермент; 2 — химотрипсин, связанный с активированным бромцианом сефарозой; 3 — химотрипсин, связанный с активированным бромцианом аминопропил-стеклом; 4 — химотрипсин, связанный с активированным бромцианом поли-(8-аминоэтил)акриламидом.

мотрипсина в 6 М мочеvine [45]. Свободный фермент полностью инактивируется за 90 мин, в то время как иммобилизованные производные в зависимости от используемого носителя сохраняют свою активность даже после 24 ч.

12.3.5. Повышение устойчивости

Витолл и Мейсон [56] изучили устойчивость иммобилизованного папаина при непрерывном катализе в зависимости от различных методов связывания со стеклом. В колоночных проточных реакторах гидролизovali 1%-ный раствор казеина при 45 °C и постоянной скорости потока и нашли время половинной потери активности ($t_{1/2}$) в ходе непрерывной работы для индивидуальных производных фермента. В то время как $t_{1/2}$ папаина, связанного с алкиламиностеклом карбодимидным методом, составляло 1,9 сут, для производного, полученного методом азосочетания на ариламиностекле, оно равнялось 7,2 сут и было равно даже 35 сут для препарата с амидными связями со стеклом, покрытым ZrO_2 .

Устойчивость иммобилизованных ферментов можно повысить с помощью предварительной модификации белков перед их присоединением к нерастворимому носителю. Так, например, Кершенгольц и др. [29] присоединили олигомеры пероксидазы — инертные белки — альбумин (пероксидаза предварительно обрабатывалась глутаровым альдегидом в присутствии инертных белков и сывороточного альбумина) к сефарозе и получили высокоактивные препараты с термостабильностью, превышающей ее величину для немодифицированной ковалентно связанной с сефарозой пероксидазы в 500 раз. Маршалл и Рабинович [35] обнаружили значительное увеличение стабильности растворимых конъюгатов фермента с углеводом, приготовленных присоединением трипсина и α - и β -амилаз к активированному бромцианом декстрану.

Следовательно, можно прийти к заключению, что стабильность ферментов, ковалентно связанных с нерастворимыми носителями, определяется не только физической или химической природой носителя, но также и характером химической модификации фермента при ковалентном присоединении его к носителю.

12.4. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

12.4.1 Аффиные лиганды

Ряд примеров применения иммобилизованных ферментов в аффинной хроматографии приведен в гл. 11. В табл. 11.1 перечислены ферменты, функционирующие как аффинные лиганды при выделении ряда веществ. В разд. 11.3 обсуждается использование иммобилизованной нуклеазы для выделения меченых пептидов из ее ак-

тивного центра при помощи аффинной хроматографии гидролиза та ингибированной нуклеазы. Количественная аффинная хроматография позволяет изучать взаимодействия иммобилизованных ферментов с их ингибиторами, кофакторами и другими веществами, образующими с ферментами специфические комплексы.

12.4.2. Исследование стабилизированных молекул ферментов и их субъединиц

Иммобилизация позволяет изучать ферменты в условиях, которые обычно приводят к их агрегации. Иммобилизация химотрипсина на стекле позволила Танизава и Бендеру [49] исследовать влияние апротонных дипольных органических растворителей на кинетику катализируемого химотрипсином гидролиза в условиях, приводящих к агрегации свободного химотрипсина. В ходе этого исследования было найдено, что кажущиеся константа Михаэлиса $K_{m(\text{каж})}$ и константа скорости деацилирования $k_{z(\text{каж})}$ существенно зависят от концентрации органического растворителя.

Поведение растворимой и иммобилизованной кислой фосфатазы в водноорганических растворах изучено Уоном и Хорватом [54]. Несколько причин привело к этому исследованию. Во-первых, оно позволяет проводить дальнейшие эксперименты, ведущие к лучшему пониманию механизма ферментативной активности. Во-вторых, оно открывает возможности следить за влиянием температур $< 0^\circ\text{C}$, что невозможно осуществить в водных растворах. Поскольку *in vivo* ферменты, связанные с мембраной, обычно находятся в липофильном микроокружении, исследование действия ферментов в водноорганических растворителях или на матрицах с гидрофобными группами может внести вклад в выяснение поведения ферментов в их естественном окружении. Ферментативные реакции в органических растворителях могут быть также использованы для субстратов с низкой растворимостью в воде. Так, Уон и Хорват [54] исследовали расщепление *п*-нитрофенилфосфата кислой фосфатазой в различных водноорганических смесях и обнаружили, как правило, более высокую активность иммобилизованных ферментов по сравнению со свободным ферментом. Для смесей (1:1) различных растворителей с цитратными буферами с различными pH установлено, что ферментативная активность зависит от pH водного буферного компонента, а не от pH водноорганической смеси, измеренного стеклянно-каломельной электродной парой. Из этого следует, что иммобилизованные ферменты менее экспонированы в органические растворители, потому что истинная концентрация воды выше в непосредственной близости к иммобилизованным молекулам белка, чем во внешнем растворе. Кроме

того, ковалентные внутри- и, возможно, межмолекулярные связи могут стабилизировать структуру фермента.

Глутаматдегидрогеназа является субъединичным гексамерным ферментом с молекулярной массой 336 000. В присутствии ADP она образует линейные агрегаты с молекулярной массой $2 \cdot 10^6$, обладающие очень высокой активностью. Для того чтобы решить вопрос, является ли наблюдаемое возрастание активности следствием образования агрегатов или ADP действует как аллостерический модулятор или эффектор непосредственно на «мономерную» форму, а агрегация — это только вторичное явление, Хортон и др. [25] присоединили «мономерную» форму глутаматдегидрогеназы к пористым стеклянным микросферам. Установлено, что в присутствии ADP даже в этом случае происходит возрастание активности, то есть возрастание активности не зависит от ассоциации.

Иммобилизация протеолитических ферментов предотвращает их автолиз (и также агрегацию) и позволяет проводить исследование даже в условиях, когда в случае свободных ферментов происходит быстрый автолиз. Примером является исследование термически индуцируемых конформационных переходов иммобилизованных α - и β -трипсинов при 20—75°C [12].

Иммобилизация может быть использована также для предотвращения спонтанной ассоциации между субъединицами олигомерных белков. Она позволяет, например, определить, является ли субъединичная форма фермента каталитически активной. Если да, то сравнение свойств фермента со свойствами соответствующего иммобилизованного олигомера может дать ценную информацию о влиянии взаимодействий субъединиц на ферментативные функции. Примером может служить работа Чена и др. [6], иммобилизовавших мышечную альдозу в условиях, когда присоединяется только одна из четырех субъединиц. С помощью гуанидинхлорида молекулы фермента, связанного с нерастворимым носителем, были диссоциированы и элюированы с колонки таким образом, что на колонке остались только ковалентно связанные развернутые субъединицы. Удаление диссоциирующего реагента приводило к свертыванию в нативную конформацию иммобилизованных субъединиц. При использовании мягких диссоциирующих реагентов было показано, что иммобилизованный мономер обладает той же активностью, что и тетрамер.

Иммобилизация позволила также механическим путем регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов [3]. Иммобилизованный трипсин на эластичном носителе, как, например, на нейлоне, уменьшает ферментативную активность при растягивании носителя — нейлонового волокна. Причина этого может состоять в деформации молекул белка. Из-за небольшого объема молекул фермента такие механохимические исследования трудно осуществить другим путем без иммобилизации.

12.4.3. Модели биологических систем

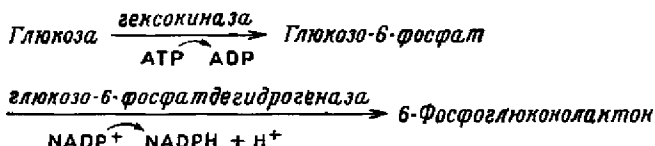
В настоящее время общепринято, что только немногие ферменты *in vivo* действительно существуют в виде свободного белка в водной среде и что большинство из них связано с мембранами или нерастворимыми ансамблями или находятся в гелеобразном окружении. По Кемпиеру и Миллеру [28], например, фактически все внутриклеточные ферменты водоросли *Euglena gracilis* связаны с корпускулярными фракциями клетки.

Ферменты, присоединенные к хорошо охарактеризованным носителям, могут служить простыми моделями биологических систем, которые находятся в живых клетках. Действительно, синтетические полимерные матрицы точно не воспроизводят ситуацию *in vivo*, однако исследование таких моделей является важным этапом в рассмотрении ферментативного катализа как гетерогенного процесса [38]. Прежде всего они механически более устойчивы. Хорошо определенная химическая структура матриц позволяет изучать влияние только одного параметра, такого, как влияние гидрофобности или влияние заряженных частиц на ферментативное действие. Можно также изучать влияние микроокружения матрицы, а также эффекты, возникающие благодаря различным локальным концентрациям субстрата, продукта, протонов эффекторов и т. д. Эти различия в локальных концентрациях возникают в результате каталитической активности ферментов или влияния соседних молекул ферментов. Влияние микроокружения на активность и стабильность иммобилизованных ферментов детально обсуждается в разд. 12.2 и 12.3. Влияние, оказываемое матрицей, с трудом можно отличить от влияния микроокружения, создаваемого в результате собственно ферментативной реакции как самого фермента, так и других окружающих ферментов.

Поскольку многие ферменты производят или используют протоны, возможно, что такое их действие могло бы модифицировать активности других ферментов и таким образом регулировать метаболические пути. Гестрелиус и др. [14] использовали модельную систему, содержащую включенные гексокиназу, глюкозооксидазу и трипсин. При pH 8,6 (оптимальное значение для гексокиназы) 15% добавленной глюкозы фосфорилируется, а остальная окисляется глюкозооксидазой (оптимум pH 6,6). После добавления субстрата трипсина его гидролиз приводит к накоплению протонов в микроокружении утилизирующих глюкозу ферментов. Хотя внешний pH поддерживается постоянным при 8,6, подкисление микроокружения ведет к уменьшению гексокиназной активности с одновременным возрастанием глюкозооксидазной, что приводит к полному окислению глюкозы.

Иммобилизация двух последовательно работающих ферментов на одной матрице может служить простой моделью ситуации *in*

vivo, когда ферменты расположены в последовательном ряду на мембранах или внутри гелеобразных структур. Впервые такая двухстадийная ферментативная система описана Мосбахом и Маттасоном [41]:



Ферменты иммобилизованы с помощью ковалентной связи с бромцианактивированной сефарозой или включением в сшитый полиакриламид. Скорость суммарной реакции, катализируемой ферментами, присоединенными на одном носителе, сравнима со скоростью, получаемой, если взяты свободные ферменты в количествах, эквивалентных по активности (в единицах на объем инкубационного раствора) ферментам в иммобилизованной системе. Другие системы, взятые для сравнения, составлены из индивидуальных ферментов, иммобилизованных на отдельных полимерных частицах. Все системы достигали окончания лаг-периода раньше стационарного уровня производства НАДРН. Однако система, в которой ферменты иммобилизованы на общей матрице, достигали стационарного состояния раньше, чем соответствующая растворимая система или система ферментов, иммобилизованных на отдельных частицах. Наконец, стационарные скорости во всех трех системах были одинаковыми. Из этого следует, что в иммобилизованной системе продукт реакции, катализируемой первым ферментом, находится в окружении второго фермента в более высокой концентрации, чем в случае, соответствующем свободной системе. Это может быть отнесено как к близкому расположению молекул ферментов в иммобилизованном состоянии (при иммобилизации могут быть достигнуты такие относительные концентрации различных ферментов, которые не достижимы в свободном виде в растворе), так и к затрудненной диффузии промежуточного продукта благодаря диффузионному слою Нернста вокруг ферментполимерных частиц в перемешиваемых растворах [38]. Таким образом, следующий фермент в последовательном ряду действует более эффективно, и скорость всей реакции возрастает. Эта двухферментная система была затем расширена до трехферментной [36], включающей β -галактозидазу, гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. И в этом случае иммобилизованная система значительно более эффективна в начальной фазе, чем соответствующая растворимая система.

Так называемые «искусственные ферментные мембраны» являются другим примером интересных модельных систем.

Например, гексокиназа и фосфатаза, сшитые с инертным белком, образуют мембраны, которые могут действовать как глюкозный насос.

Мультиферментные системы важны не только теоретически, но и практически. Так, было показано [4], что для препаративного производства глюконовой кислоты из глюкозы более выгодно использовать двухферментную систему — глюкозооксидазу и каталазу, совместно иммобилизованных на одних частицах носителя, — по сравнению с ними же, но иммобилизованными на разных частицах. В этом случае преимущество заключается в локальном обогащении субстратом каталазы — кислородом.

12.4.4. Применение иммобилизованных ферментов

Иммобилизованные ферменты находят применение главным образом в следующих четырех областях [38]:

- 1) ферментная технология, называемая также ферментной инженерией;
- 2) аналитические исследования;
- 3) медицинские исследования;
- 4) органическая химия.

Иммобилизация ферментов приводит к получению специфических гетерогенных катализаторов, которые могут быть повторно использованы, если они достаточно стабильны. Нерастворимый фермент можно отделить от реакционной смеси фильтрованием или центрифугированием. На колонках можно осуществлять непрерывный катализ, что позволяет автоматизировать катализируемые процессы. Одновременное или последовательное действие нескольких ферментов может быть легко достигнуто смесью иммобилизованных ферментов или послойным наполнением ими колонки. Реакции, катализируемые иммобилизованными ферментами, обычно требуют меньше места для аппаратуры и легче контролируются. При присоединении ферментов к подходящему носителю они становятся часто более стабильными по сравнению со свободными ферментами (разд. 12.3). Применение инкапсулированных или включенных в матрицу ферментов в медицине может предотвратить иммунологические реакции организма.

Большое внимание всегда уделяется применению иммобилизованных ферментов в промышленности. Например, можно упомянуть промышленное производство L-метионина из рацемической смеси ацетил-D,L-аминокислоты, в котором используется иммобилизованная аминокислотаза [50]. Производительность полностью автоматизированного процесса в ферментном реакторе составляет 700 кг L-метионина в день и 60% стоимости обычного одноразового процесса, осуществляемого с использованием нативного фермента [38]. Другим примером является получение 6-аминопеницилланао-

вой кислоты из пенициллина с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы [32].

Наиболее важным промышленным использованием иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности является, по-видимому, производство кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы, где используется иммобилизованная глюкозоизомераза, превращающая D-глюкозу в D-фруктозу. В процессе, осуществляемом фирмой Clinton, Corn Processing (США), 93%-ный раствор глюкозы изомеризуется в 42%-ную фруктозу с производительностью 227 тыс. тонн в год. Продукт экономически конкурентоспособен с инвертируемым сахаром, получаемым из сахарного тростника и сахарной свеклы. Другим промышленным применением иммобилизованных ферментов является производство сиропа с высоким содержанием фруктозы из крахмала с использованием трехферментного процесса, включающего α -амилазу, глюкоамилазу и глюкозоизомеразу. Согласно рекламному проспекту фирмы, объем этого производства в 1974 г. составил 450 тыс. тонн, что представляет собой, очевидно, наибольший объем использованных иммобилизованных ферментов [38]. Опубликован ряд обзоров по применению иммобилизованных ферментов [2, 37, 39, 43, 57, 58].

В аналитических исследованиях в связи с иммобилизованными ферментами необходимо упомянуть ферментные электроды [21], ферментные термисторы [40] и ферменты, ковалентно связанные с полистиролом или нейлоном для целей автоматического анализа [24, 46]. Гильбо [22], например, использовал ферментные электроды для определения глюкозы, мочевины, L-аминокислот, галактозы, ацетилхолина и дегидрогеназ. Ферменты, связанные с капиллярными реакторами, использованы в соединении с автоанализатором фирмы Technicon для анализа различных субстратов, таких как глюкоза, мочевина и мочева кислота [55]. Гудзон и др. [20] описали применение иммобилизованной холинэстеразы для контроля воздуха и воды, для обнаружения ингибиторов фермента, таких, как пестициды. Система характеризуется чрезвычайной чувствительностью. Например, органофосфат параоксон может быть обнаружен в количествах $1:10^7$ в воздухе и воде.

В медицине используются главным образом инкапсулированные ферменты, например уреазы — для снижения уровня мочевины в крови [9] или аспарагиназы — для уменьшения уровня L-аспарагина [7]. Обзоры по применению связанных ферментов в медицине опубликованы Чангом [8], Витолом [55] и др.

Последний из аспектов применения иммобилизованных ферментов, упомянутых Мосбахом [38], является органический синтез в исследовательских лабораториях для различных небольших по масштабу синтезов. Примером является синтез порфобилиногена из двух молекул δ -аминолевулиновой кислоты, катализируемой иммобилизованной дегидрогеназой δ -аминолевулиновой кислоты

[23]. Ввиду многочисленных преимуществ даже в этой области в ближайшем будущем можно ожидать более широкого применения иммобилизованных ферментов [27].

12.5. «СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ»

В разд. 12.4 было показано, что присоединение ферментов к нерастворимой матрице открывает много возможностей для исследований в различных направлениях. Уже сегодня можно видеть, что исследования не будут ограничиваться только использованием природных ферментов и имитацией метаболических путей, осуществ-

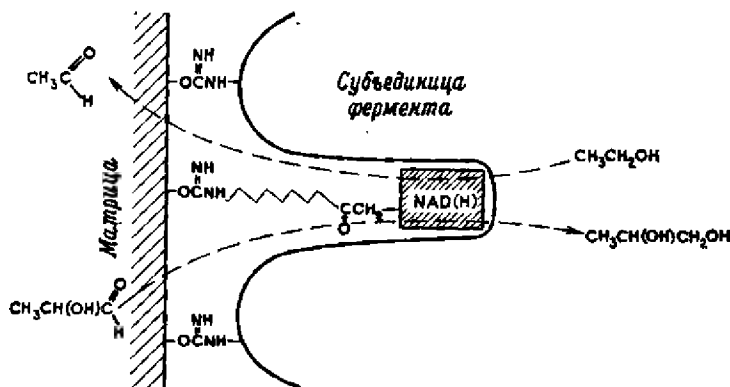


Рис. 12.8. Схематическая диаграмма активного комплекса алкогольдегидрогеназы-NADH-сефарозы [13].

Фермент и аналог NADH — N^6 [(6-аминогексил)карбамоилметил]-NADH — были одновременно присоединены к активированной бромцанном матрице в условиях, допускающих образование фермент-коферментного комплекса. Кофермент был регенерирован *in situ* путем проведения реакции окисления — восстановления между двумя субстратами алкогольдегидрогеназы — этиловым спиртом и молочным альдегидом. Результаты показали, что эти иммобилизованные фермент-коферментные комплексы ответственны почти за всю активность, присущую препаратам, т. е. алкогольдегидрогеназную активность в отсутствие свободного кофермента.

ляющихся в природе. Формирование различных условий микроокружения молекул ферментов и возможность их модификации создают предпосылки для получения высокоэффективных катализаторов, обладающих свойствами, отличающимися от свойств нативных ферментов. Создание новых «искусственных» клеток, осуществляющих полные метаболические превращения и циклы, также не невозможно. Для этого независимого направления приготовления искусственных биологических систем Мосбах [38] предложил название «синтетическая биохимия».

На рис. 12.8 приведен пример так называемой «синтетической биохимии». Гестрелиус и др. [13] присоединили алкогольдегидрогеназу ковалентно к носителю, который уже содержал ковалентно

связанный общий лиганд NAD^+ . Таким образом получен фермент, который в отличие от нативного фермента не требовал для своей активности свободного кофермента. Регенерация восстановленного кофермента, образующегося после окисления спирта в ацетальдегид, осуществлялась одновременным добавлением «альтернативного» субстрата — молочного альдегида. Возможно, что для других оксидоредуктаз для регенерации кофермента может быть использована подобная пара субстратов [или может быть даже заменена искусственными акцепторами и (или) донорами электронов]. Этот последний пример ясно показывает близкое родство между аффинной хроматографией и иммобилизацией ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Axén R., Ernback S., *Eur. J. Biochem.*, **18**, 351—360 (1971).
2. Иммобилизованные ферменты. Т. 1, 2./Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинек. — М.: Изд-во МГУ, 1976.
3. Berezin I. V., Klíbanov A. M., Martinek K., *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 193—199 (1974).
4. Bouin J. C., Atallah M. T., Hultin H. O., *Methods Enzymol.*, **44**, 478—488 (1977).
5. Brümmer W., Hennrich N., Kiockow M., Lang H., Orth H. D., *Eur. J. Biochem.*, **25**, 129—135 (1972).
6. Chan W. W.-C., Mort J. S., Chong D. K. K., MacDonald P. D. M., *J. Biol. Chem.*, **248**, 2778—2784 (1973).
7. Chang T. M. S., *Nature* (London), **229**, 117—118 (1971).
8. Chang T. M. S., *Artificial Cells*, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill., 1972, pp. 1—207.
9. Chang T. M. S., Gonda A., Derks J. H., Malove N., *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, **17**, 246—257 (1971).
10. Datta R., Ollis D. F., *Advan. Exp. Med. Biol.*, **42**, 293—315 (1974).
11. Engasser J. M., Horvath C., *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 178—192 (1974).
12. Gabel D., Kasche V., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 1011—1018 (1972).
13. Gestrelíus S., Mansson M. O., Mosbach K., *Eur. J. Biochem.*, **57**, 529—535 (1975).
14. Gestrelíus S., Mattiasson B., Mosbach K., *Eur. J. Biochem.*, **36**, 89—96 (1973).
15. Goldman R., Goldstein L., Katchalski E., in: *Biochemical Applications of Reactions on Solid Supports*, G. R. Stark (Ed.) Academic Press, New York, 1971, pp. 1—78.
16. Goldstein L., *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 1—17 (1973).
17. Goldstein L., Katchalski E., *Z. Anal. Chem.*, **243**, 375—396 (1968).
18. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E., *Biochemistry*, **3**, 1913—1919 (1964).
19. Goldstein L., Pecht M., Blumberg S., Atlas D., Levin Y., *Biochemistry*, **9**, 2322—2334 (1970).
20. Goodson L. H., Jacobs W. B., Davis A. W., *Anal. Biochem.*, **51**, 362—367 (1973).
21. Guilbault G. G., *Pure Appl. Chem.*, **25**, 727—740 (1971).
22. Guilbault G. G., *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, Marcel Dekker, New York, 1976, pp. 445—543.
23. Gurne D., Shemin D., *Science*, **180**, 1188—1190 (1973).
24. Hornby W. E., Fillipuson H., McDonald A., *FEBS Lett.*, **9**, 8—10 (1970).
25. Horton H. R., Swaisgood H. E., Mosbach K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 1118—1124 (1974).

26. Johansson A. C., Mosbach K., *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 339—353 (1974).
27. Jones J. B., in: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, J. B. Jones, C. J. Sik, D. Perlman (Eds.), Wiley, New York, 1976, pp. 1—46.
28. Kempner E. S., Miller J. H., *Exp. Cell. Res.*, **51**, 150—156 (1968).
29. Керуцгольц Б. М., Угарова Н. Н., Березин И. В., *Биоорг. хим.*, **2**, 264—272 (1976).
30. Konecny J., Slanicka J., *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 573—578 (1975).
31. Konecny J., Slanicka J., *Pathol. Microbiol.*, **42**, 245—247 (1975).
32. Lagerlöf E., Nathorst-Westfeldt L., Ekström B., Sjöberg B., *Methods Enzymol.*, **44**, 759—768 (1977).
33. Manecke G., Vogt H. G., *International Symposium on Analysis and Control of Immobilized Enzyme Systems*, Compiegne, France, 1975.
34. Manecke G., Vogt H. G., *Makromol. Chem.*, **177**, 725—739 (1976).
35. Marshall J. J., Rabinowitz M. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 777—779 (1975).
36. Mattiasson B., Mosbach K., *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 253—257 (1971).
37. *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, R. A. Messing (Ed.), Academic Press, New York, 1975.
38. Mosbach K., *FEBS Lett.*, Suppl., **62**, E80—E95 (1976).
39. *Methods Enzymol.*, K. Mosbach (Ed.), **44**, 1—999 (1977).
40. Mosbach K., Danielsson B., Borgerud A., Scott M., *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 256—265 (1975).
41. Mosbach K., Mattiasson B., *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2093—2100 (1970).
42. Ong E. B., Tsang Y., Perlmann E. G., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5661—5666 (1966).
43. *Enzyme Engineering*, E. K. Pye, L. B. Wingard, Jr. (Eds.), Vol. 2, Plenum Press, New York, London, 1974.
44. *Insolubilized Enzymes*, M. Salmona, C. Saronio, S. Gerattini (Eds.), Raven Press, New York, 1974.
45. Schnapp J., Shalitin Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 8—14 (1976).
46. Sundaram P. V., Hornby W. E., *FEBS Lett.*, **10**, 325—327 (1970).
47. Sundaram P. V., Pye E. K., Chang T. M. S., Edwards V. H., Humphrey A. E., Kaplan N. O., Katchalski E., Levin Y., Lilly M. D., Manecke G., Mosbach K., Patchornik A., Porath J., Weetall H. H., Wingard L. B., Jr., *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 3, 15—18 (1972).
48. Svensson B., *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 954—963 (1976).
49. Tanizawa K., Bender M. L., *J. Biol. Chem.*, **249**, 2130—2134 (1974).
50. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I., *Enzymologia*, **31**, 225—238 (1966).
51. Turková J., Hubálková O., Kriváková M., Čoupek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 1—9 (1973).
52. Turková J., Vancurová D., Šaber M., unpublished data.
53. Valentová O., Turková J., Lapka R., Zima J., Čoupek J., *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 192—196 (1975).
54. Wan H., Horvath C., *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 135—144 (1975).
55. Weetall H. H., in: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, R. A. Messing (Ed.), Academic Press, New York, 1975, pp. 201—226.
56. Weetall H. H., Mason R. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 455—466 (1973).
57. *Enzyme Engineering*, L. B. Wingard, Jr. (Ed.), Interscience, New York, 1972.
58. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, A. Wiseman (Ed.), Ellis Horwood, Chichester, 1975.

Исследуя гидрофобные пространственные группы, Лоу [1] показал, что гидрофобная цепь может вносить ощутимый вклад в образование специфического комплекса.

На рис. 1 показана хроматография L-лактат- и L-аланиндегидрогеназ на сефарозе с привязанными производными аденозин-5'-монофосфата (АМР). Длина пространственных групп для всех производных одинакова, но гидрофобность этих групп различна. Гидрофобность первой группы гексаметилендиамина (рис. 1, а) максимальна. Следующие за ней пространственные группы (рис. 1, б, в, г), содержащие пептидные связи, обладают постепенно понижающейся гидрофобностью, причем последнее производное с гидроксилом у адениновой группы наиболее гидрофильно. Оба фермента сильно сорбируются на производном аденозина, содержащем гидрофобный гексаметилендиамин. При увеличении гидрофильности пространственной группы сорбируемость линейно уменьшается. Из данных рентгеноструктурного анализа некоторых дегидрогеназ следует, что аденозиновая часть NAD^+ связывается в «кармане», выстланном неполярными аминокислотными остатками, и что важную роль при связывании этой части кофермента с ферментом играют гидрофобные взаимодействия.

Для исследования влияния гидрофобных цепей на взаимодействие лактатдегидрогеназы с 8-(ω -аминоалкил)-производными аденозин-5'-фосфата Лоу [1] синтезировал производные, содержащие полиметиленовые пространственные группы разной длины. Как видно из рис. 2, определенные в растворе значения констант ингибирования (K_i) лежат в интервале 1—6 ммоль/л, достигая максимальной величины для 8-(4-аминобутил)аденозин-5'-фосфата. Для иммобилизованных производных на сефарозе сила взаимодействия между лактатдегидрогеназой и соответствующими иммобилизованными аффинными лигандами, определенная по концентрации NADH , необходимой для вытеснения фермента со специфического сорбента, при увеличении числа метиленовых групп возрастает, что можно объяснить повышающейся доступностью иммобилизованного аффинного лиганда. На основании этих наблюдений снижение способности дегидрогеназ сорбироваться на производных с

гидрофильными пространственными группами (рис. 1) можно, вероятно, объяснить образование водородных связей между гидрофильной группой и матрицей полисахаридного носителя, что пред-

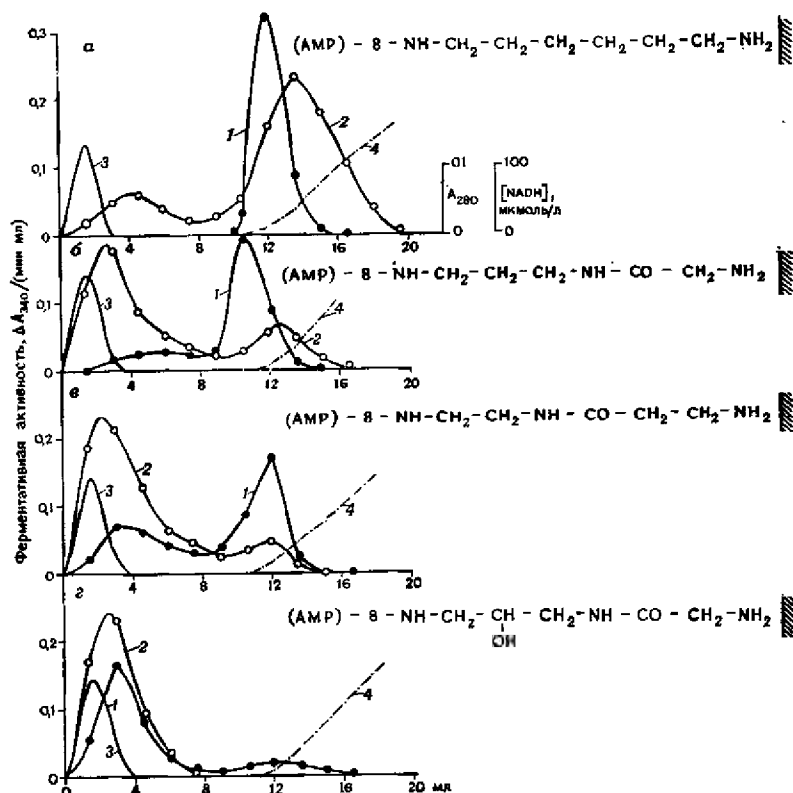


Рис. 1. Хроматография L-лактат- и L-аланиндегидрогеназ на сефарозе с привязанными производными AMP.

1 — лактатдегидрогеназа из мышцы кролика; 2 — аланиндегидрогеназа *B. subtilis*; 3 — бычий сывороточный альбумин; 4 — градиент NADH.

отвращает взаимодействие аффинанта с комплементарным ферментом.

Рис. 3 наглядно иллюстрирует неспецифическое и специфическое взаимодействия между ферментом и аффинным адсорбентом. На верхнем рисунке показана неспецифическая многоточечная связь между инертными белками и иммобилизованными аффинными лигандами. На среднем рисунке изображены множественные связи фермента, который хотя и содержит участок, комплементарный иммобилизованному аффинному лиганду, однако сорбирован в неправильной ориентации. Неспецифические связи, образующиеся

с группами подлинного аффинанта, пространственной группой или носителем, могут быть обусловлены электростатическими и гидрофобными взаимодействиями или их комбинацией, а также другими взаимодействиями. Неспецифические множественные связи могут

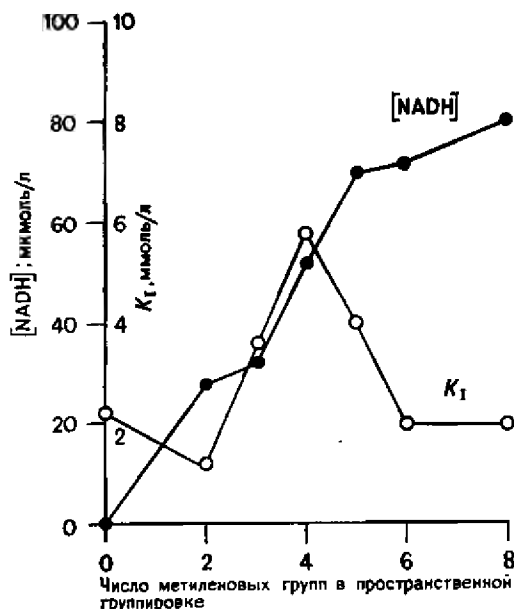


Рис. 2. Взаимодействие лактатдегидрогеназы с 8-(ω -аминоалкил)-АМР, содержащей полиметиленовую группировку различной длины.

быть сильнее одной специфической связи между выделяемым ферментом и иммобилизованным аффинным лигандом. На нижнем рисунке для сравнения показана специфическая комплементарная связь выделяемого фермента с иммобилизованным лигандом. При низкой концентрации привязанного аффинанта множественные неспецифические связи не могут реализоваться, поэтому происходит только биоспецифическое связывание молекул фермента по активному центру, если, конечно, образование такой связи стерически возможно. Дело в том, что из-за неравномерной поверхности геля, например макросетчатого полимера оксиалкилметакрилатного геля (рис. 3), связанные через пространственную группу аффинные лиганды делятся на хорошо доступные, менее доступные и стерически недоступные. Пространственные препятствия могут быть одной из причин не только низкого насыщения иммобилизованных молекул аффинанта выделяемым ферментом, но также их гетерогенной аффинности. Поэтому нужно подходить к каждо-



Рис. 3. Характер связей, образующихся при связывании фермента на аффинном сорбенте.

а — неспецифическая связь фермента на неспецифическом аффинном сорбенте; **б** — неспецифическая связь фермента на специфическом аффинном сорбенте; **в** — специфическая связь фермента на специфическом аффинном сорбенте.

му разделению аффинной хроматографией индивидуально и устанавливать как оптимальную концентрацию аффинанта, так и характер и длину пространственной группы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lowe C. R., Eur. J. Biochem., 73, 265—274, 1977.

К главе 8

Большой интерес представляет применение магнитных полимеров в качестве носителей для биологических молекул. Преимущество таких препаратов состоит в легкости их выделения при наложении магнитных полей. Мосбах и Андерсон [1] разработали общий метод применения магнитных жидкостей, позволяющий намагничивать полимеры после их модифицирования биологическими молекулами. Магнитные жидкости — это жидкости, состоящие из взвешенных ультрамикроскопических частиц ($\sim 100 \text{ \AA}$) магнитной окиси железа. Частицы магнитной жидкости стабилизированы покрытием толщиной $25 \text{ \AA}$, предотвращающем их слипание в магнитном поле. Эти частицы удерживаются в виде коллоидной суспензии за счет броуновского движения. Магнитные жидкости (феррофлюиды), содержащие частицы феррита, были использованы в виде коллоидов в воде или углеводородах. Они ведут себя как истинно гомогенные жидкости, однако весьма чувствительны к воздействию магнитного поля. Для получения магнитного аффинного сорбента сорбент на основе сефарозы обрабатывают феррофлюидом с последующим намагничиванием в магнитном поле. Использование магнитных полимеров в аффинной хроматографии позволяет быстро «вытаскивать» молекулы из коллоидных растворов или растворов с культурами клеток и мицеллем. Такое быстрое «вытаскивание» молекул очень трудно достижимо или совершенно невозможно при обычных методах выделения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mosbach K., Andersson L., Nature, 270, 259—261 (1977).

К главе 9

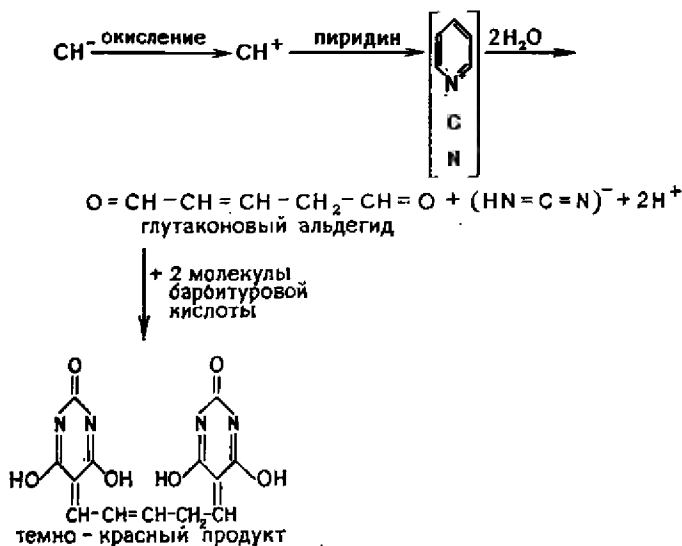
Кон и Вилчек [1] разработали колориметрический метод контроля активации полисахаридных носителей бромцианом, основанный на образовании темно-красного комплекса, имеющего $\epsilon_{575}^{575} 15000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, при взаимодействии цианатных эфиров с пиридином и барбитуровой кислотой [2]:

Реагент для качественной реакции

12 мл пиридина медленно смешивают с 2,5 мл конц. HCl (ч. д. а.), затем добавляют 0,5 г барбитуровой кислоты и доводят объем до 20 мл дистиллированной водой. После перемешивания примерно в течение 10 мин получают прозрачный бесцветный раствор. При хранении в холодном темном месте раствор устойчив в течение нескольких недель в зависимости от чистоты используемых реактивов. Небольшое окрашивание реагента не мешает качественной реакции.

Реагент для количественного определения

8 мл пиридина медленно смешивают с 1,6 мл конц. HCl (ч. д. а.) при охлаждении, добавляют 50 мг барбитуровой кислоты и доводят объем до 10 мл водой. Реагент для количественного определения следует готовить непосредственно перед использованием.



Качественное обнаружение свободного BrCN или цианатных эфиров активированных полисахаридов

К 10—20 мг сухого или 0,1—1,0 мл набухшего влажного полисахарида или к нескольким каплям водных промывок свежеактивированного материала добавляют 1,2 мл реагента для качественной реакции. После легкого встряхивания в присутствии < 5 нмоль BrCN или цианатного эфира возникает темно-красное окрашивание. Окраска развивается в течение 30 с и становится максимальной через 10 мин.

Калибровочный график

Для приготовления стандартных растворов (~ 1 —10 мкмоль/мл) реагента, содержащего CN^+ -ионы, используются большие одиночные кристаллы свежесублимированного BrCN. После реакции со свежеприготовленным стехиометрическим количеством реагента (10 мл) при 40°C в течение 15 мин ϵ_{575} составляет $15000 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$. Калибровочный график $A_{575} - [\text{CN}^+]$ линеен до $[\text{CN}^+] = 60 \text{ нмоль/мл}$.

Количественное определение цианатных эфиров полисахаридов

К образцу полисахарида, содержащему от 1 до 20 мкмоль цианатных эфирных групп, добавляют 10 мл реагента для количественного определения. Смесь выдерживают в течение 15 мин на водяной бане (40°C) при энергичном встряхивании, затем фильтруют через стеклянный фильтр. Осадок тщательно промывают водой. Окраска может глубоко проникнуть в полисахарид, однако промывание несколькими миллилитрами диметилформамида приводит к удалению адсорбированной окраски, и полисахарид остается лишь слабо-розовым. Объединенный фильтрат доводят до определенного объема дистиллированной водой и измеряют оптическую плотность раствора при 575 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohn J., Wilchek M., Biochem. and Biophys. Res. Comm., 84, 7—14 (1978).
2. Konig W., J. Pract. Chem., 69, 105—110 (1904).

К главе 11

В работе Олсона и др. [1] при разделении ферментов и антигенов аффинной хроматографией применялись методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, которую отличают использование небольших колонок, высоких скоростей разделения, связанных с этим высоких давлений в системе и, что наиболее существенно, относительно небольших количеств анализируемых веществ. Носителем для иммобилизации аффинных лигандов служил силикагель, поскольку получаемые аффинные сорбенты на этом носителе могут работать в условиях высокого давления. Наиболее ярким примером эффективности такого метода служит разделение в течение 5 мин H_4 и M_4 изоформ лактатдегидрогеназы на колонке с N^6 -(6-аминогексил)-АМР—силикагелем в градиенте NADH.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ohlson S., Hansson L., Larsson P. O., Mosbach K., FEBS Letters, 93, 5—9 (1978).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ ХРОМАТОГРАФИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

- Азидин 124, 337
 Агароза 297
 Агглютинации фактор 361
 Агглютинин(ы) 339
 аксинеллы 340
 Аденилатциклаза 297
 S-Аденозил-L-метионин-декарбоксилаза 297
 Аденозин 334
 Аденозинмонофосфаты
 зависимые ферменты 297
 3',5'-дифосфаты 344
 циклокислотные белки 349
 Аденозинтрифосфатаза 297, 315
 мембраносвязанная 315
 Адренокортикотропный гормон 336
 Адренергический рецептор 349
 Акрозин 317
 Актин 361
 Аланинкарбоксипептидаза 317
 Алкогольдегидрогеназа 112, 300
 из дрожжей 60, 268
 Альбумин 349
 связанный с веществами 361
 сыворотки см. Сывороточный альбумин
 — человека 290
 Альгиназы 297
 Альдегидоксидаза 313
 Альдегидредуктаза 385
 Альдолаза 162
 Альдостеронсвязывающие макромолекулы 349
 Амилаза 162
 α -Амилаза 297
 β -Амилаза 298
 Аминоацил-tРНК-синтетаза 164, 327
 Аминоацетилсоединения связывающие гликопротеины 349
 Аминокислоты специфические 368—369
 Аминоксидаза 313
 Аминопептидаза 317
 Ангидрохитриксин 332
 Ангиотензин I, ферментпревращающий 317
 Ангиотензин, сывороточный прогормон 337
 Анти-A-агглютинин 340
 Антиагглютинин соевых бобов γ -глобулин 289
 Анти-B-гемагглютинин 340
 Антиген(ы) 290
 карциномэмбриональный, иммуноактивная фракция 362
 Антигела 283—290
 антисыворотка к α -фитопротеину 280
 антисыворотка к *Shigella sonnei* 280
 антигемоглобулин, аутоантигела 280
 α -антитрипсин 337
 Анти-A-фитогемагглютинин 340
 Антинаителсинтаза 327
 Антинаителфосфорилтрансфераза 329
 Апопутаматоксалацетаттрансаминидаза 298
 Апо-B-оксипутаматдегидрогеназа 300
 Аполизинфенолидаза 298
 Аполизинфенолидаза 298
 Арабинозидаза 309
 Артиназа 298
 Арилатульфатазы 298
 Аспарагиназа 298
 модифицированная тетранитрометаном 298
 Аспартаза 299
 Аспартаминотрансфераза 330
 Аспарат- β -декарбоксилаза 299
 Аспараттранскарбамиллаза 299
 Аспартокиназа I — гомосериндегидрогеназа 300
 Ацетил-CoA-апокарбоксилаза 296
 Ацетилглюкозаминидаза 306
 N-Ацетил- β -глюкозаминидаза 296
 N-Ацетил-D-глюкозаминсвязывающий белок 349
 N-Ацетил-D-глюкозаминспецифический белок 339, 343
 Ацетилтрансфераза 329
 Ацетилхолинэстераза 80, 158, 295
 Ацетилхолиновый рецептор 80, 348
 Ацилтрипсин 332
 ADP-глюкозоэпифосфорилилаза 315
 Бактериофаг 292
 Бактериофаг f2 репликаза 299
 Бактериофаг T4 357
 Белки 348—354
 бактериальные 355
 карбоксилнесущий 349
 коагулянтный 355, 358
 липофильные 356
 мембранный рецепторный 352
 мембраны эритроцитов 280
 рецептор связанный 348—354
 рибосомальные 358
 SH-содержащие 354, 355
 сыворотки см. Сывороточные белки
 тринитробензол, модификация 290
 фага 355
 фактор 357
 Белок A
 из *Staphylococcus aureus* 292
 — сыворотки крови акулы 292, 396
 Белок C4 355
 Билюбин 361
 Бiotin 294
 Бромеланин 322
 Валил-tРНК-синтетаза 329
 Вирус(ы) 360, 361
 алеутской болезни норки 360
 гриппа 361
 растения 361
 табачной мозаики 361
 Вителлогенин 292
 Внутренний фактор 363
 Галактаза 307
 Галактоза 335
 в биополимерах 335
 оксидаза 313
 Галактозаминоглианы 334
 Галактозидаза(ы) 307
 из *E. coli* 307
 кислая 297
 фрагменты 333
 Галактозилтрансфераза 331
 Галактоманн 334
 Гапены 290
 Гексозаминидаза 308
 Гемагглютинин(ы) 340—341
 Гемопротейны P-450 367
 Гем-пептиды 359
 Гидролизиды 309
 Гиббереллины 361
 Гипоксантин : гуанинфосфорилтрансфераза 331

- Гистаминаза 308
 Гистидиндекарбоксилаза 308
 Гистидинолфосфатаминотрансфераза 331
 Гистоны 355
 киназа, регуляторная субъединица мозга овинья 333
 фосфатаза 308
 цистеинсодержащая 354
 Гликоген 335
 Гликогенсинтаза 327
 Гликогенфосфорилаза 315
 Глюкозидаза 308
 кислая 297
 Глюкозилтрансферазы 331
 Гликопротеин(ы) 334, 335
 аминокислотусвязывающие 349
 рецепторы 351
 Гликофорин А 335
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 302
 Глицерин-3-фосфатдегидрогеназа 302
 NAD-зависимая, цитозоля 299
 Глицерокиназа 268, 310
 IgM-Глобулины 291
 IIS-Глобулин соевых бобов 336
 Глутаматдегидрогеназа 301, 302
 Глутаматформиминотрансфераза 331
 γ-Глутамилгидролаза 308
 γ-Глутамилтрансфераза 331
 Глутаминсинтетазы 327
 Глутатионредуктаза 325
 Глюкагон
 иммунореактивность 291
 как рецептор 351
 ¹²⁵I-меченый 335
 Глюкоамлаза 308
 β-Глюкозидаза 308
 Глюкозооксидаза
 6-фосфатдегидрогеназа 60, 301
 — NADPH-связанная I11
 фосфатизомераза 142
 Глюкокиназа 76, 309
 Глюкокортикоид, рецептор 351
 β-Глюкуронидаза 308
 Гоададотропин
 рецепторы 351
 хорионный 336, 350
 Гормон(ы) 336, 337
 как рецептор 350
 лютеинизирующий 336
 фолликулостимулирующий 336
 Грамицидин-S-синтаза 328
 Гуанилатциклаза 308
- Дегидрогеназы 300—305
 изоферменты 300
 Дезаминазы 300
 Дезоксиаденозиннуклеотид 334
 3-Дезокси-D-арабиногентиулозонат-7-фос-
 фатсинтетаза 327
 изоэпимеры 327
 транс-N-Дезоксирибозилазы 331
 Дезоксирибонуклеаза 305
 ингибитор 337
 Дезоксирибонуклеиновая кислота 334
 нуклеопротеины, SH-содержащие 354
 полимераза 316
 Дезоксипитидин 344
 ДТ-Диафараза 306
 Дигидроптеросинтаза 327
 Дигидрофолатредуктаза 325
 β-3,5-Диксифенилаланин, D- и L-изомеры 359
 ДНК см. Дезоксирибонуклеиновая кислота
 Допамин-β-гидроксилаза 306
- Жгутиковые клетки 293
 Жирные кислоты, синтаза 327
- Зимогены 317—325
- Изонитрилоты поливалентные 337, 338
 Изолейцил-tRNA-синтаза 328
 α-Изопропиламалатизомераза 309
 α-Изопропиламалатсинтаза 328
 Изонитратдегидрогеназа 164, 303
 ADP специфичная 305
 Иммуноглобулин(ы)
 анти-β-микроглобулин 289
 антитоксические компоненты 289
 антитромбин 289
 из сыворотки 291
 — — человека 289
 кортизонсвязывающий 350
 поверхности лимфоцитов 291
 связывающий фактор 352
 углеводспецифичные 289
 Иммуноглобулин А человека 291
 Иммуноглобулин G, ¹²⁵I-меченый 289
 Иммуноглобулин М человека 291
 крысы и кролика 291
 Ингибиторы 337—339
 семенной плазмы 338
 Инициация фактор 366
 Инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа 303
 Инсулин 75, 336
 рецептор 123, 352
 Интерфероны 115, 362
- Калликрин 320
 Карбоангидраза 299
 Карбоксилаза, субъединица 333
 Карбоксипептидаза 318
 Каталаза, ингибитор 337
 Катепсин(ы) 318
 Катепсин D, ингибитор 338
 Катехол-о-метилтрансфераза 330
 Δ⁴-Кетостероидизомераза 309
 Киназа(ы) 308, 310
 субъединицы 335
 фосфорилазы 310
 Клетки 292—294
 Клеточные органеллы 292—294
 Клостридиопептидаза 319
 Клостридин 319
 Коагуляцин фактор 361
 Коллаген 358
 Коллагеназа 319
 Коллаген-галактозилтрансфераза 330
 Коллаген-глюкозилтрансфераза 330
 Комплемент человека, компонент C1 361
 Конканавалин А 340
 рецептор 350
 Кофакторы 294
 Кофермент А 294
 связывающий белок 350
 Креатинкиназа 309
 Кровь, групповые вещества 334, 335
 Ксантиндегидрогеназа 305
 Ксантиноксидаза 313
 β-Ксилозидаза 332
 Ксилозилтрансфераза 331
- β-Лактамаза 311
 Лактатдегидрогеназа 268, 303
 изоферменты 17, 303
 β-Лактоглобулин 352

- Лактозосинтаза 328
 Лейцил-тРНК-синтаза, 328, 329
 Лектин(ы) 339—343
 иммобилизованные 378
 специфичный группы крови А 340
 Лецитин: холестерин-ацилтрансфераза 391
 Лизергид 291
 Лизинвазопрессин 336
 ¹²⁵I-меченый 336
 Лизоцим 267, 311
 Лимфоциты 291, 293
 везикулы мембран 293
 Липазы 311
 Липоксигеназа 311
 Липопротейн 357
 Липопротеналипаза 311
 Лютеинизирующий гормон см. Гормон лютеинизирующий
 Люцифераза 311

 α-Макроглобулин 291
 Малатдегидрогеназа 60, 305
 Малилацетонизомераза 311
 «Малик» ферменты, NADP-зависимые 312
 Мальтодекстринфосфоорилаза 315
 Манноза ³H-меченая, олигосахариды 335
 α-Маннозидаза 311
 кислая 297
 Мембраны 293
 белки эритроцитов 290
 рецепторный белок 352
 ферменты плазмы 315
 Меркаптоальбумин 354
 Меромнозин 356
 тяжелый 356
 Метилгл-тРНК-синтаза 328
 Мвиозин 355, 357
 Миоинозитол, активные ферменты 306
 фосфатсинтаза 328
 Моноаминоксидаза вторичная 326
 Мононуклеотиды 346

 Наркотики мембраносвязанные, центр связывания 363
 Нейраминидаза(ы) 312
 Нейрофины 352
 Неомидинфосфотрансфераза 331
 Никотин-ацетилхолиновый рецептор 352
 Никотинамиддинуклеотидзависимая дегидрогеназа 269
 Никотинамиддинуклеотидзависимая трансгидрогеназа 312
 Нитратредуктаза 325
 Нитритредуктаза 325
 Нуклеаза(ы) 48, 165, 259, 312
 стафилококковая 313
 Нуклеиновые кислоты 344—348
 Нуклеиновые основания 130
 Нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза 131
 Нуклеотиды 130, 344—348

 Обратная транскриптаза 326
 Овальбумин 291, 352
 флуоресцентный 290
 Овомукоид 338
 Овоингибитор 338
 Овофлавопротеин 355
 D-3-Оксибутиратдегидрогеназа 302
 Оксидазы 313
 NADPH-Оксидоредуктаза 313
 15-Оксипроагландиндегидрогеназа 302
 3-Окстеронидизомераза 314
 Олигонуклеотиды 346
 Оротидфосфорибозилтрансфераза 163
 Оротидилатдекарбоксилаза 165

 Пенциллин, связанный с компонентами 160
 Пептиды
 аффинно-меченые 358
 ДНФ-лизисодержащие 358
 из связывающего участка антителитро-
 фенильных антител 359
 метинонисодержащие 359
 нитротирозинсодержащие 129, 359
 рибонуклеазы, синтезированной твердо-
 фазным методом 360
 синтетические 360
 специфические 358, 359
 тирозинсодержащие 360
 триптофансодержащие 360
 цистеинсодержащие 358
 SH-содержащие 354, 355
 Пероксидаза 314
 Пиридинилуклеотидтрансгидрогеназа 305
 Пиридоксалькиназа 310
 Пиридоксин-5'-фосфатоксидаза 313
 Пиримидинолгонуклеотиды 347
 Пиروفосфатаза 163
 Пируваткиназа 163
 Пируватферменты
 карбоксилаза 325
 киназа 163, 310
 оксидаза 313
 Плазма крови, фактор VII 361
 Плазмамембранные ферменты 314
 Плазмин-α₂ ингибитор 338
 Плазминоген 321
 NH₂-концевой активационный пептид 359
 Полиадениловая кислота 346
 Полигалактуроназа 315
 Полиинозиновая кислота 347
 Полимеразы 316
 Полинууклеотид(ы)
 аленозинмонофосфатом богатые 344
 Полинууклеотидкиназа T₄ 310
 Полинууклеотидфосфоорилаза 315
 Полирибозадениловая кислота 347
 Полирибосомы 294
 Полисахариды 335
 Полисомы 294
 Полиурядиловая кислота 347
 полимеразы 316
 Полицитидиловая кислота 347
 Предшественник белка (P32) головки бак-
 териофага T₄ 357
 Прекалликреин 321
 Прокарбоксипептидаза 321
 Пролактин 337
 Протилгидроксилаза 317
 Пропердин 363
 Протаминкиназа 310
 Протеиназа(ы) 317
 кислая 317
 стрептококковая 322
 Протектин анти A₁H₂ 342
 Протеогликаны 336
 Протеолитид холинэргический 343
 Протоклаагенпролингидролаза 324
 Протромбин 321
 Птерон-олиго-γ-L-глутамилэндосептидаза 322

 Редуктазы 325
 субединицы 333
 Ренин 322
 gal-Репрессор 361
 trp-Репрессор 363
 Рецептор(ы) 348—364
 адренэргический 349
 ацетилхолиновые 349
 гликопротеина 351

- глюкогона 351
 гонадотропина 351
 инсулина 332
 и перенос белков 348—354
 конканавалина А 350
 лютеинизирующего гормона 350
 мембранных белков 352
 никотинацетилхолиновый 352
 связанные белки 348, 349
 стероидного комплекса 353
 тиротропина 354
 холинэргический 306
 хориального гонадотропина человека 350
 цикло-АМР-белков 349
 экдизона 350
 эстрадиола 351, 352, 354
 Рибонуклеаза(ы) 326
 изомы 326
 ингибитор 339
 S-пептид, синтезированный твердофазным методом 360
 синтетические фрагменты 360
 Рибофлавинсинтаза 329
 Рибофлавин-5'-фосфат 295
 РНК 347
 РНК(гуанин-7)-метилтрансфераза 331
 микросомальная 346
 полимераза 316
 — из *E. coli*
 растворимая 347
 рибосомальная 347
 иРНК 344—345
 тРНК 345, 346, 346
 цистроны 363

 Сахариды 334, 335
 Связывающие белки 349—351
 Связывающий половой гормон 353
 Семенная плазма человека, ингибитор 338
 Серил-тРНК-синтаза 329
 Синтазы 327—329
 Синтазы 327—329
 Сомато-мастотропин хоровный челове-
 ский 362
 Старый желтый фермент см. NADPH-Ок-
 сидоредуктаза
 Стеронд(ы)
 изомераза 327
 Δ⁴-Δ⁵-кетонизомераза 327
 оксидегидрогеназа 302
 3-оксонизомераза 314
 рецепторные комплексы 353
 Стрептокиназа 327
 Субилизинподобный фермент 328
 Сукцинатдегидрогеназа 305
 Сукцинаттиокиназа 310
 Сульфидрильная протенназа 323
 Сыворотка крови, белки 336
 Сывороточный альбумин 353
 бычий 352
 человека 351, 353

 Тайхоевая кислота 122
 α-глюкозиллированная 362
 Термоллизин 323
 Тетрагидрофлатдегидрогеназа 305
 Тиминпирофосфокиназа 310
 Тимидилатсинтаза 329
 Тимидин 348
 Тимидинкиназа 310
 Тимоциты 292, 294
 Тиоредоксин 292
 Тирозил-тРНК-синтаза 165, 329
 Тирозиназа 332
 Тирозинаминотрансфераза 331

 Тирозингидроксиназа 332
 Тиронидный стимулятор 336
 Тиротропиковый рецептор 354
 Токсин дифтерийный 361
 из *Vibrio cholerae* 133
 холерный 361
 Трансгидрогеназы 332
 Транскарбоксилаза, субъединицы 334
 Транскортин 354
 Трансферазы 329, 331
 Трегалозофосфатсинтаза 329
 Треониндезаминаза 299
 L-Треониндегидрогеназа 305
 Триацилглицерилиназа 332
 Триглицеридлипаза 311
 Тридакнин 343
 Трипсины 267, 272, 323
 ацилпроизводное 322
 ингибитор 339
 Streptomyces griseus 322
 Трипсиноподобный фермент 324
 Триптофан 360, 367
 Триптофангидроксиназа 332
 Триптофанил тРНК-синтаза 329
 Триптофансинтаза 329
 субъединицы 333
 Тромбин 323
 Тромбиноподобный фермент 323
 Тропомизолин 358
 Тропонин 358
 Тропонин I 339
 Тубулин 363

 Уреаза 332
 Урадин 348
 Уридинфосфатглюкозодегидрогеназа 305
 Урокиназа 324

 Фавин 340
 Фаг T4 294
 Фактор VII плазмы крови 361
 Фактор X свертывания крови человека 341
 Фенилаланингидроксиназа 314
 Фенилаланил-тРНК-лигаза 314
 Фенилаланил-тРНК-синтаза 328
 субъединицы 334
 Фенолоксидаза 313
 Фермент, разрушающий разветвления по-
 лисахаридов 330
 Ферменты
 адеозинфосфатзависимые 297
 бактериолитические 299
 действие на миоинозитол 306
 «малые»-NADP-зависимые 312
 модифицированные производные 332—334
 пиродоксаль-5'-фосфатзависимые 329, 331
 плазмомембранные 314
 протеолитические 321
 субъединицы 332—334
 флавиномононуклеотидзависимые 306
 химотрипсиноподобные 319
 Ферритин 356
 α-Фетопротенины 356
 Антисыворотка 289
 Фибриноген 355
 производные 356
 Фитоагглютинины 117
 Фитогемагглютинины 342
 Фицин 319
 Флавинадеиндинуклеотид 294
 Мононуклеотидзависимые ферменты 306
 Флавокиназа 306

- Фолликулостимулирующий гормон см. Гормоны
 Формиминотетрагидрофолатциклодезаминаза 306
 Фосфатаза(ы) 314
 фосфорилазы 315
 щелочная 315
 Фосфатацетилтрансфераза 331
 3-Фосфатидил-1'-глицеро-3'-фосфатсинтетаза 328
 Фосфолипидкиназа 163
 Фосфоглюконатдегидрогеназа 304
 Фосфодиастераза 315
 Фосфолипаза 311
 Фосфопротеинфосфатаза 315
 Фосфорилаза 315
 глюкоксилизирующая 315
 Фосфофруктокиназа 112
 Фруктозо-1,6-дифосфатаза 162
 α -Фукозидаза 306
 Фукозосвязывающие белки 340
- Химотрипсин 108, 267, 272
 ингибитор 337
 α -Химотрипсин 56, 319
 Химотрипсиноген 319
 Химотрипсинподобные ферменты 319
 Хлорамфениколацетилтрансфераза 330
 Холинкиназа 309
 Холинфосфат-цитидилтрансфераза 330
- Холинэргический протеолипид 355
 рецепторный белок 350
 Холинэстераза 299
 Хоризматмутаза 299
 Хоризматсинтаза 327
 Хроматин 357
- Цитидин 344
 Цитохром c 325
 Цитохром P-450 299
 Цитохромоксидаза 313
 Цитратсинтаза 327
- Экизон, рецепторы 350
 Экзоамилаза 306
 Экзонуклеаза 312
 Эластаза 322
 Эндонуклеаза 312
 Эндополигалактуроназа 306
 Энтерокиназа 306, 319
 Энтеротоксин 361
 Энтеродагидроноептеринтрифосфатсинтаза 327
 Эритроциты 293
 белки мембран, модифицированные три-нитробензолом 290
 G1-Эстераза 306
 Эстрадиол 336
 рецепторы 351—353
 17 β -Эстрадиолдегидрогеназа 301
 Этаноламинкиназа 309

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агароза 184—199

- активация бромцианом, связывание аффинных лигандов 186, 188—194
- введение групп оксирана 194
- неспецифическая адсорбция 194, 195
- оксирана активированная с бискарбоксиметиламиногруппами 171
- отрицательно заряженная 152
- присоединение с помощью бензохинона 198, 199
- — бифункциональных оксиранов 194
- — — N-оксисукцинимидовых эфиров 197, 198
- — — тиол-дисульфидного обмена 196, 197
- производные 184—198
- алкила 152
- ω -аминоалкила 153
- ε -аминокапронил-D-триптофана, метиловый эфир 139
- ε -аминокапронилфукозамина 139, 364
- *l*-аминофенилртути(II) ацетата 139
- 5'-(4-аминофенил)фосфорилуридин-2'(3')-фосфата 139
- анти-BCA 139
- анти-IgG (человека) 139
- арсениловой кислоты 139
- ганглиозиддиаминопропиламина 134
- гексан аденозина 145
- гексан кофермента А 144
- гексан никотинамидадениндинуклеотида 144
- гексан нуклеотида 145
- гексан поли(Y)-поли(C) 364
- гексан тиола 147
- гемоглобина 147
- глутатион-2-пиридилдисульфида 124, 125
- детергенноподобные 189
- диаминодипропиламинсукцинил-N-фенилаланинисулина 123
- ДНК 93, 145
- ингибитора трипсина 139
- казенна 139
- каприлгидразида 154
- конканавалина 139—142
- L-лизина 139
- меркаптооксипропилового эфира 195, 196
- смешанные дисульфидные 196

- тироксина 139
- тринодтиронины 139
- D-триптофана 139
- L-триптофана 139
- углеводов 151, 152
- L-фенилаланина 139
- фетуина 134
- цистеина 147
- AG-NAD, тип I 364
- Gly-Gly-Tyr(OBz)-Arg 139
- NADP 110, 364
- SAG (аггель) 185
- солюбилизация 245
- солюбилизованная, спектры 245
- стабильность 185
- степень активации 189
- сукцинированные аминокислотные производные 197
- щелочное десульфирование 194
- Адибиновая кислота, дигидразид как пространственная группа 110, 374
- Адсорбция 21 22, 27, 33, 265
- изотерма 36—38, 55—57, 62, 63, 105
- Ленгмюра 106
- однообразный процесс 21, 22, 27, 33, 265
- энтальпия 86
- энтропия 86
- Азидный метод 239, 240
- Азосочетание, разрушение дитионатом натрия 232
- Азот, количественное определение 248
- Аквалак 210
- Активированный пептид 380
- Алкогольдегидрогеназа, влияние температуры на связываемость 89
- Алкенил-O-гликозиды, сополимеризация с акриламидом 118
- Алlostерический эффектор 111
- Альбумин — агароза, хроматография 377
- Альбумин бычий сывороточный 155
- иммобилизованный на микрокапсулах 384
- 4-Аминобензамидин 143
- Аминогруппы, кислотно-основное титрование 238
- определение методом восстановительного метилирования 247
- реакция с 2-окси-1-нафталальдегидом 239
- флуорескаминный метод 241
- 2-Амино-4,6-дихлортриазин 179

- ε-Аминокапроновая кислота, иммобилизованная
 как пространственная группа 68, 264
 определение после кислотного гидролиза 247
 — титрованием или по количеству азота 194
 привязанная к сефарозе 211
 Аминокислоты иммобилизованные, определение после кислотного гидролиза 247
 модификация специфическим реагентом 127
 — активного центра 126
 — избирательная 127
 на сополимерах в качестве носителя 210
 2-Амино-2-оксиметилпропан-1,3-диол, блокирование групп 218
 2-Аминоэтанол 216
 Амфифильные гели 156
 Антигены, выделение 115, 116
 Антитела антидинитрофенильные, использование для выделения пептидов 129, 130
 взаимодействие с антигенами 114
 влияние титра антисыворотки 115
 гетерогенность участков связывания 114—116
 иммобилизованные, выделение интерферонов 115
 к нитротирозину 128
 удаление из крови 383—385
 Аррениуса график 86
 Ассоциация процессы 44
 константа K_i 373
 Ацетилхолинэстераза, изучение активного центра 374
 Афигели 185, 187, 364
 свойства как носителей 187
 Афигель 10 218
 приготовление 197, 198
 Аффинанты см. Аффинные лиганды
 Аффинная гель-фильтрация 16, 64, 65
 Аффинная пертурбация плотности, принципы 165
 Аффинная хроматография 15—19
 высокоэффективная 131—132
 математическое моделирование результатов 33
 определение небольших количеств антител 16—19
 принципы 7—11
 система с небольшими лигандами и макролигандами 107
 теория на основе равновесной модели 20—32
 терминология 1, 2
 элюирование 15, 160—162, 164
 — влияние концентрации аффинного лиганда 164
 — после химической модификации иммобилизованного аффинного лиганда 107, 116
 Аффинный гель, сополимеризация алкил-О-гликозидов с акриламидом 167
 Аффинный электрофорез 166—170
 Аффинные лиганды 15, 436—438
 выбор 104—148
 высокомолекулярные, связывание с матрицей 73
 избирательность 107
 иммобилизованные, характеристика 336—356
 — взаимодействие с ферментом 75—76
 — влияние гетерогенности 272, 273
 — меченые, определение по радиоактивности 249
 — полярные, определение кислотным основным титрованием 246
 — продажные 139, 364—366
 использование 282—366
 — конкуренция 91—92
 концентрация 25, 45, 67, 75—81
 — критическая 80
 — оптимальная 75
 насыщение 25, 26, 34
 плотность 51
 после иммобилизации 274
 связывание на сорбенте 62—102
 Аффиноза 364
 Белки
 специфически меченные, выделение 126, 127
 иммобилизованные, конформационные изменения 253—255
 — белковый баланс до и после связывания 244, 247
 — определение колориметрическими методами 244
 — — по количеству аминокислот после кислотного гидролиза 247
 — — — триптофана
 — — спектрофотометрическими методами 244
 — — флуориметрическим анализом 244
 — — элементарным анализом 248
 — распределение, определение методом флуоресцентной микроскопии 255
 липофильные 154

- негомогенное связывание 278
 необратимое связывание со специфическими сорбентами 277
 неспецифическая сорбция 276
 связывание 231
 содержащие SH-группы, выделение 124, 125
 транспорт, выделение 122—124
 Бензохинон, присоединение к агарозе 198, 199
 Биоафинная хроматография 9, 15
 Биогели разных марок 200
 Биоглас 209
 Биологически активные вещества, взаимодействие 371—374
 Биологические системы, искусственные 443
 Биоэлюция 15
 Бис-(3-аминопропил)амин 95
 Бисдiazобензидин, бифункциональный реагент 203
 Бисоксиран 194, 202
 поперечное сшивание агарозы 195
 3,6-Бис-(меркуриметил)диоксан 203
 Бифункциональные реагенты 203—204
 Блокирование
 карбонильных групп 218, 219
 непрореагировавших групп 216
 Борогидрид натрия 184
 Бромацетилбромид — целлюлоза 179
 Бромацетилирование 213
 Взаимодействие гидрофобное неспецифическое 214
 биологически активного вещества 371—374
 пептидов с нуклеотидами 59
 Виниловые сополимеры 210
 Винильные группы, определение 242
 Вирусы, выделение 135, 136
 Витамины 124
 Время инкубации (уравновешивания), влияние на емкость сорбента 85
 Высаливание, влияние на адсорбцию 155
 Высаливающая хроматография, гидрофобная, использование неионных амфифильных гелей 154—156
 ВЭТТ (высота, эквивалентная теоретической тарелке) 83
 β-Галактозидаза, влияние концентрации анионов на адсорбцию 156, 157
 Гаптоглобин, связанный с сефарозой 4В, взаимодействие с гемоглобином 371
 Гексаметилендиамин, привязанный к сефарозе 211
 Гексаметилендиизоцианат 204
 Гексокиназа 268
 Гель амфифильный 156
 — пористость 64—68
 Гемоглобин, α- и β-цепи, взаимодействие с гептоглобин — сефарозой 371, 372
 Гетерогенность, коэффициент 373
 Гидразидные группы, кислотно-основное титрование 238
 Гидроксилламин, расщепление тиолсложноэфирных связей 213, 232
 Гидрофобная бессолевая хроматография, использование неионных амфифильных гелей 155, 156
 Гидрофобная «ножка» в хроматографии 151—158, 272, 277
 — — интерферонов 377
 Гидрофобное взаимодействие 154, 156
 Гистерезис, влияние ионной силы 100
 Гистидин, комплекс с цинком и медью 170
 Гистон-гистонные взаимодействия 374
 Гликаминозилекс 139
 Гликоген 355
 синтаза 327
 фосфорилаза 315
 Гликозидаза 308
 кислая 297
 Гликозилекс А 139, 365
 Гликозилтрансферазы 331
 Гликопротеины, очистка 120, 121
 Глицин, блокирование непрореагировавших групп 218
 Глобулин
 α₁-кортикостероидсвязывающий 350
 γ-кортикостероидсвязывающий 290
 связывающий половой гормон 353
 11 S соевых бобов 336
 человека 291
 IgM 291
 Глутаровый альдегид 204
 Глюкагон, рецептор 122
 Глюкозамин, блокирование непрореагировавших групп 218
 Гонадотропин
 рецепторы 351
 хорионный 336, 350
 Гормоны
 взаимодействие с комплементарными рецепторами 121
 выделение 133, 134
 Градиент вогнутый 18
 Гофмейстеровские лиотропные ряды 157, 262, 263

- Двусубстратные ферментативные реакции 109
- Десорбция аффинного лиганда 219—221
как функция времени и pH 220
математический подход 221—225
полупериод, вычисление 222 224
примеры 220
- Диазониевые соли, привязывание к носителю К—МДА 182
- Диальдегидкрахмал — метилденданилин 181
- Диальдегидкрахмал, продажный 182
- 1,3-Диамино-2-пропанол как пространственная группа 214
- Дивинилсульфон 203
- 5,5'-Дитиобис-(2-нитробензойная кислота) 243
- Диметиладипинимидат 203
- Диметилсуберимидат 203
- Дициклогексилкарбодимид 198
- Диэтилмалонилимидат 203
- О,О-Диэтилфторфосфат 158
- Додециламин 133
- Изомочевина, О-ацилпроизводное 212
- Изотерма связывания 36—38, 55—57, 62, 63, 105
- Изотиоцианат, флуоресцентная метка в ферментах 255
- Иммобилизация
влияние на константу диссоциации 47, 49, 72
модификация аффинных лигандов 375
- Иммобилизованные ферменты 10, 138, 420—444
активность 421—431
влияние гидрофобности носителя 431
— ионизирующих групп 426
— природы и концентрации буфера 428
— химической природы носителя 427
классификация 420 422
концентрация на поверхности и активность носителя 425
модели биологических систем 439
относительные активности 421
применение 436—443
— в медицине 441, 442
— — промышленности 441, 442
присоединение к нерастворимым носителям 442—431
стабильность 431—436
— и влияние гидрофобной подложки 431
— — — pH 433
— — — температуры 433
— — денатурирующие агенты 434
- — лиофилизация 432
— повышение 436
стерические ограничения 423
тиол-дисульфидный обмен 196—197
- Иммуноаффинная хроматография 114—116
- Иммуносорбенты 114, 115
использование в медицине 384, 385
- Ингибиторы, выделение 108
- Индубиоза А4 365
- Интерферон(ы) 116
связывание, исследование с помощью гидрофобного лиганда и лецитиновой хроматографии 377—388
- Ионная сила, влияние на сорбцию и десорбцию 90, 91, 94—96, 261—263, 269
линейный градиент 271
- Ионообменники в аффинном элюировании 160
- Исключение вторичное 82
- Капсулы для удаления антител с помощью экстракорпорального потока 383, 384
- Карбодимид 154, 211, 212
приготовление эстрадиол — сефарозы 213
реакция конденсации 211, 212
- Карбоксилатные группы, кислотно-основное титрование 238
- Карбоксильные группы, реакция с глицином 239
- Катализ гетерогенный 422—424
- Кислотно-основное титрование 246
- Клетки
выделение 135, 136
лимфодные 135
топология 166
фракционирование на волокнах 135
- Ковалентная аффинная хроматография 125, 158—160
- Количественная аффинная хроматография 44—54
- Колонка
время уравнивания 83
геометрия 80
концентрация лиганда 80
операционная емкость 45, 50
суммарное количество лиганда 80
эффективность 83
- Колоночная хроматография 82
на агарозе с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином 367
математическое моделирование результатов 32—35

- Комплекс, образование и влияние ра-
створимого ингибитора 91, 92
- Конкурентные ингибиторы для элюиро-
вания 91, 92
- Константа
ассоциации K_i 372, 373
взаимодействия лиганд — фермент K_L
21, 30, 34, 45, 47
влияние ионной силы 94—101
диссоциации бинарного комплекса K_i
45, 47, 62
кажущаяся зависимость $K_{каж}$ содер-
жания иммобилизованного фермен-
та 431
распределения, влияние температуры
86—89
- Конформационная подстройка 82
- Конформационное включение 72, 73
- Конформационные изменения, изучение
с помощью метода фулуоресценции
253
- Кооперативная адсорбционная колоноч-
ная хроматография 38—42
- Хроматограммы 40—42
- Кооперативное связывание
теория 36—42
элюирование 55—57
- Кофакторы
выделение 113
иммобилизованные 110, 111
- Кьельдала метод 248
- Лектины**
выделение 116—118
иммобилизованные 118
классификация на основе сродства
119, 120
свойства 117, 118
- Ле Шателье* принцип 86
- Лиганды, обзор 104, 105
- Липиды, выделение 133
- Матричная хроматография 59, 133
- Медь
комплекс с гистидином и цистеином
170
хелаты 172
- Мембраны
топология 167
фракционирование фрагментов 165
- 3-Меркаптопропионидат 196
- 2-Меркаптоэтанол 218
- Меркогель 210
- Меромкозин тяжелый 275
- Метакрилатные гели
оксикальциевые 205
- привязывание белков с помощью ак-
тивных эфиров 206
- приготовление 205
- продажные 205
- производные
— глицидила 208
— *п*-нитрофенильных эфиров, емкость
242
реакция с ε -аминогруппой 207
- ртутьметакрилатилида 214
- связывание белков как функция рН
и концентрации 206—208
- стабильность 205
- удаление непрореагировавших групп
218
- Металлохелатная аффинная хроматогра-
фия 170—172
- N-Метилпиридиний-2-альдоксим 159
- N-Метил-2-пирролидон 192
- 4-Метилумбеллиферил-*п*-(N,N,N-триме-
тиламмоний)циннамат (MUTMAC)
252
- Метод связывания, общие вопросы
228—232
- Мето-*п*-толуолсульфонат-1-циклогек-
сил-3-(2-морфолиноэтил)карбодии-
мид 211
- Микроокружение 12, 228, 424
- Микрофлуориметрический иммуноана-
лиз, изучение распределения антител
383
- «Мнимая аффинность» 95
- Наркотики, мембраносвязанные 363
- Насыщения эффект, оптимальные усло-
вия 275, 276
- Найлоновые матрицы 210
- Небиоспецифическая адсорбция 49—54,
101
- Неконкурентное действие ингибитора
при элюировании 91, 92
- Неспецифическая сорбция 276—279
влияние ионной силы 94, 95
- Неспецифические влияния 94—102
- Нингидрин, колориметрия 249
- п*-Нитрофенил-*п'*-гуанидинбензоат 250
- Носители 236—256
выбор 225
использование 282—321
нерастворимые, блокирование непро-
реагировавших групп 216—219
пористость 64
характеристика 174—177
- Нуклеаза, фрагменты, комплементарное
взаимодействие 368, 369
- Нуклеиновые кислоты
выделение 130—132

- изучение последовательности 132
привязанные к матрицам инертным 130
основания, высокоэффективная аффинная хроматография 130—132
периодатное окисление 180
привязывание 180, 231, 232
- Нуклеозиды**
высокоэффективная аффинная хроматография 130—132
иммобилизованные, определение по фосфору 374, 248
- Нуклеотиды**
иммобилизованные, влияние концентрации лиганда на сродство 25
— взаимодействие с пептидами 59
— с ферментом, изучение природы 74
определение после гидролиза 247, 248
связанные с носителем 2, 73, 130, 231, 232
- Ньютона — Рафсона метод 222
- NAD⁺ производные, сорбция глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы 100**
- NADH, вогнутый градиент**
иммобилизованный, определение 244
- Объем образца 263**
- 15-Оксипростагландиндегидрогеназа 302**
- Оксиановые группы**
блокирование 170
агарозы, алкиламинные связи 195
— сложноэфирные связи 195
— тиюэфирные связи 195
- N-Оксисукцинимидный эфир агарозы 197**
- Олигоадениловая кислота, кооперативное элюирование 38, 39**
- Олиго(dT)-целлюлоза 146, 147, 365**
- Операционная емкость 48, 50**
- Органофосфаты, иммобилизованные 158**
- Остаточные отрицательно заряженные группы, определение 237**
- Отщепляемая группа 158**
- Папаин 320**
иммобилизованный, стабильность 229
- Пенициллиназа 314**
- Пенициллин, связанный с компонентами 160**
- Пепсин 320, 321**
- Пепсиноген 321**
- Пептиды**
выделение 126
иммобилизованные, определение после кислотного гидролиза 247
меченные по сродству 126, 127
синтетические, очистка 369
содержащие цистеин 129
— гистидин 129
— SH-группы, выделение 124, 125
— лизин 129
— метионин 129
— триптофан 129
специфичные, выделение 126—128
- Периодатное окисление**
нуклеиновых кислот 180
привязывание белков 184
- Пероксидаза 314**
- Пики, траектории 41, 56**
- Плазминоген В — сефароза, активация пептидов, изучение 380**
- Полиакриламидный гель, аффинный электрофорез 166, 167**
и бифункциональные реагенты 203, 204
привязывание белков после активации азотистой кислотой 201, 202
— после активации тиофосгеном 202
— с помощью глутарового альдегида 204
производные 200, 201
с привязанным полисахаридом 168
стабильность 201
характеристика 200, 201
- Полиакриловая кислота с алифатическими аминами, фракционирование ТРНК 156**
- Полистирольные матрицы 210**
- Полифаг К29 166**
- Полупревращение 93**
время 221, 224
- Порагел 210**
- Присоединение**
гидроксильных групп 179, 186, 195
диазосочетанием, стабильность 200
карбоксильных групп 187, 208, 211—213
по аминогруппе 186, 195, 204, 206—212
смешанное 230, 231
тиоловых групп 186, 196, 170, 200, 201
- Пространственная группа 68—73, 210—213**
1,4-бис-(2,3-эпоксипропокси)бутан 196
влияние длины «ножки» 69—71
гидразидная 189
гидрофильная 95, 213
— примеры 214
— синтез 214
гидрофобная 95, 213
неспецифическое связывание 211
общие замечания 225—228
поливалентная 215
применение 282—319

- синтез 210
 Пространственное модифицирование при десорбции 270
 Протеиназа (ы) 317—324
 иммобилизованные, титрование активных центров 250—252
 ингибиторы 337—339
 кислая 322
 нейтральная 320
 щелочная 317
 Пуассона распределение 223

 Равновесие 24, 25
 зависимость от времени 100
 константа адсорбции K_s 97
 — — влияние ионной силы 94—97
 Равновесная модель для адсорбции с постоянной константой связывания 20—27
 элюирование конкурентным ингибитором 26, 30 33
 — путем изменения K_L 26—30
 Радиоавтография, распределение иммобилизованных белков 256
 Радиоактивные аффинные лиганды, оп-
 редделение 249
 Радиомуноанализ, твердофазный ме-
 тод 380, 381
 Расщепление АТР, изучение с помощью
 аффинной хроматографии 377
 Реагент Вудворда 204
 Рецепторы
 выделение 122—124
 комплементарность взаимодействия с
 глюкагоном 122
 — — — гормонами 122
 — — — мембранной структурой 122
 Ртуть в аффинной хроматографии 124

 Сахара, метод связывания 195, 231
 Сахариды 334, 335
 выделение 120
 Связываемость β 58, 60, 68, 79, 83—85
 влияние температуры 86
 термофилов 88
 Связывающие белки 349—354
 выделение 122—124
 свойства 124
 Сера, определение 248
 Сефадекс 117, 366
 БД-Сефадекс 142
 Сефадекс LH-20 366
 Сефазимтрипсин 366
 Сефароза
 бензильированная поперечношитая
 дибромпропанолом, степень замеще-
 ния 242
 блокирование цианогенактивирован-
 ных групп 218, 277
 бромцианактивированный аффинант,
 гидразидсвязанный 215
 в комплексе с алкогольдегидрогеназой
 и NADH 443
 влияние на емкость концентрации ли-
 ганда 75
 — — — температуры 86
 — — — pH 90
 — — связывание температуры 86
 голубая 265
 замещенная *N*-алкиламином 277
 — изомочевина, конъюгат 152, 189
 — 4-фенил-*N*-бутиламиноом 277
 — — замена гуанидиновой связью 189
 отщепление аффинного лиганда 189
 производные
 — ω -аминоалкила 153
 N^6 - ω -аминоалкил-AMP 69
 — N^6 -(6-аминогексил)-5-AMP 74, 75,
 77, 111, 112
 — 6-аминогексил-NAD⁺, кривые тит-
 рования 181
 — P^1 -(6-аминогексил)- P^2 -(5'-адено-
 зин)-пирофосфата 74
 — — взаимодействие с миокиназой
 78
 — 6-аминопеницилланат 160
 — 5'-AMP, продажный препарат 140
 — бромцетамидэтила 213
 — гидразида 215—217
 — N_1N_2 -двузамещенные гуанидинов
 188
 — конканавалина А 121, 139, 365
 — метиламина 156, 157
 — мультиполи-D,L-аланилполилизина
 215
 — нуклеазы 128
 — плазминогена В, активация пепти-
 да 380
 — полиакрилгидразида, получение
 216
 — полилизина 215
 — — схема присоединения амина 188
 — суцциниламиноэтил 213
 — сульфогидрила 213
 — тимидин-3-(*N*-аминофенилфосфат)-
 5'-фосфата 46, 47
 — тирозила 213
 — эстрадиола 213
 — рdTr 369, 370
 со связанным бис-(3-аминопропил)ами-
 ном 95
 — — сульфаниламидом 248
 специфический сорбент для лекти-
 нов 116

- с привязанным глюкоконом 115
- с привязанными антинитротирозилан-тителами 128
 - антителами 115, 116
 - к нитротирозину 128
- сравнение свойств 193—194
- тиолаktivированная, метод связы-вания 197
- приготовление 196
- степень замещения 197
- удаление инаktivированного фермен-та 197
- электрофорез 167
- этоксияktivированная 195, 196
- АН-Сефароза 211, 379
- СН-Сефароза 211, 377
 - активированная 218
- Сефароза CL 185, 225, 366
- «Синтетическая биохимия» 443
- Сипсиана распределение 373
- Скатчарда графики 373
 - соотношение 372
- Скорость потока 81—94, 265
- Смоли тиннисвязанные 130
- Сорбенты, влияние концентрации 81
 - высокоспецифичный 104—108
 - гидрофобный 156
 - групповая специфичность 104—107
 - емкость 25
 - насыщающая 66
 - операционная 45, 48, 50
 - с иммобилизованным нуклеотидом 24
 - нуклеотидов и РНК 133, 148
 - общие замечания 225—229
 - промывание 218
 - разведение 45, 68, 76
 - регенерация 279
 - с групповой специфичностью 104
 - смешанный ионный и гидрофобный 153
 - специфичность 2
 - в контейнерах с полупроницаемыми стенками 266
 - сродство лигандного расщепления 219
 - хелатообразующие 170, 171
 - хранение 279
 - эффективность 73
- Сорбция
 - АТР-азы к иммобилизованному АТР-ингибитору, влияние Mo^{2+} 264
 - белков на алкил-сефарозе 262
 - биоспецифическая 9
 - влияние индивидуальных ионов 262
 - ионной силы 21, 94—101, 261, 262
 - концентрации аффинного лиганда 30, 31
 - — буфера 263, 264
 - различных элюентных систем 94
 - скорости потока 264, 265
 - время контакта 99, 265
 - емкость, определение 237
 - температуры 86—89
 - рН 260—261
 - концентрация субстрата 66, 81, 85
 - необратимая 276
 - неспецифическая 73, 276, 277
 - оптимальные условия образования комплекса 259
 - практические указания 264—266
 - смешанная ионно-гидрофобная 156
 - константа связывания, равнове-сная модель 26—34
 - стандартная энтальпия 86
 - энтропия 86
 - энергия 63, 89
- Составная аффинность 101, 277
- Спектрофотометрические методы, опре-деление иммобилизованных аффин-ных лигандов 243—245
- ¹H-ЯМР-спектроскопия, определение степеней замещения 246
- Специфическое образование комплекса, количественная оценка 44—61
- Стадии промывания, вычисление эффек-тивности 27—29
- Стеклянные пористые хроматографиче-ские материалы 209
 - методы привязывания 209
 - продажные 208, 209
 - производные 208, 209
 - силанизация 208
 - стабильность 208
 - CPG 209
- Стерическая доступность 64—73
- Стерические затруднения 82
 - требования 374
- Стирагель 210
- Структурные различия, определение 380
- Сульфгидрильные группы, определение 243
- Сухая масса, определение 238
- Сферон 300, продажный 366
- Сферон(ы), активация бромцианом 206
 - иммобилизованный, количество химо-трипсина и глицина как функция спе-цифического поверхностного окру-жения 175
 - с привязанным химотрипсином 113
 - характеристика и получение 205
- Сывороточные белки, фракционирование 103
- Soybean-КМ-целлюлоза, аффинный сор-бент 366
- Sumstar 190 182

- Теория тарелок 36—43, 83
 Температура, влияние на адсорбцию 86—89, 259, 260, 268
 Термодинамические параметры, определение 57
 Тимин, смолы 131
 Тимоциты, связывание на волокнах 137
 Тиолирование ферментов 196, 197—201
 Тиолэфирные связи 212, 213
 Титрование активных центров иммобилизованных протеиназ 250—252
 Токсин холерный 133
 Трансляционная энтропия 66
 Третичная структура, нарушение 75
 Триазинный метод связывания белков 179, 197
 2,4,6-Тринитробензолсульфонат, натриевая соль, цветная реакция 240
 Трипсин, комплекс с ДНР, ингибитор соевых бобов 116
 иммобилизованный, титрование активного центра 250
 тРНК-аминоацилсинтететаза, биоспецифическое элюирование 164
 мРНК, выделение 130
- Углеводы**
 иммобилизованные, определение после гидролиза 248
 полимеры, продажные 117
 связывание 231
 Удельная активность, влияние ионной силы 262
 Ультрагель 366
 Уравновешивание
 время 81—84
 условия 84
 Уреаза, микрокапсулирование 442
- Фактор очистки P_1 28**
 N,N' -(1,3-Фенилен)бисмалеимид 204
 Ферментсвязанный иммуносорбент 382
Ферменты
 выделение 108—114
 выход 27, 28, 32
 инженерия 11
 метаболизма 377
 механизм действия, исследование 374—377
 многоточечное присоединение 425
 термисторы 442
 связывание, теория 29—34
 электроды 442
 Флуорескаминный метод 241
 Флуоресцентная кювета, схема 254
 Флуоресцентная метка в ферментах 255
- Флуоресцентная микроскопия, распределение иммобилизованных белков 255
 Флуоресцентный иммуноанализ 383
 Флуоресценция как метод при исследовании конформационных изменений 253
 спектры 253, 254
 техника исследования 255, 256
 Фосфор, определение 248
 Фосфоорилаза b 152
 Фосфофруктокиназа, связывание β 89
 Фукозилекс 139
 Фукопиранозильные производные 118
 Функция разделения, вычисление 37
 AD-иммобилизованный, спектрофотометрическое определение 244
- Хелатообразующие сорбенты 170, 171**
 Химотрипсин иммобилизованный
 титрование активного центра 252
 удельная активность 425
 Холинэстераза иммобилизованная, определение пестицидов 442
 Холерный токсин 133
- Целлюлоза 177—181**
 — бензоилированная 156
 — емкость связывания 132
 — производные 177—181
 обработка бисульфитом натрия 132
 общие вопросы 225
 продажные препараты 177, 179
 производные
 — 3-аминобензилборной кислоты 143
 — аминокексила, с ингибитором трипсина 143
 — аминододецила, сукцинизированные 143
 — бромцетилбромида 179
 — ДНК 145
 — олиго (dT) 143, 146, 365
 — олигодезокситимидиновой кислоты 130
 — — специфичность к молекулам, содержащим полиадениловую кислоту 143
 ДЭАЗ-Целлюлоза 154
 Центр связывания, гетерогенность 373
 комплементарность 73
 ориентация 82
 1-Циклогексил-3-(2-морфолинэтил)метил-толуолкарбодинимид 212
 Цинк, комплексы с гистидином и цистеином 170
- Шиффово основание 181**

- Экстракорпоральная система, схема 383, 384
- Электрофорез аффинный 166—170
- Элементный анализ 248
- Эмман реактив 243
- Элюэнты хаотропина 107
- Элюирование
- анализ профиля 65, 66
 - аффинными лигандами 27, 90—94, 106—108, 266
 - биоспецифичность 15, 16, 27, 160
 - влияние вариабельности градиента 268, 269
 - концентрации растворимого аффинанта 49—53, 268
 - в градиенте 268, 269
 - — концентрации KCl 111, 270
 - — pH 111, 269
- детергентами 278
- концентрационная зависимость 39
- кооперативное 55—57
- относительные объемы 60
- при изменении pH 108, 268
- различными солевыми концентрациями 157
- с ионообменников 164
- солевыми растворами 111, 268
- ступенчатое 267
- температурная зависимость 38
- ударным введенным АТФ-Mg²⁺ 111
- — NaOH 268
- условия 266—271
- фермента при изменении среды 26
- без стадии промывки 26—29
 - выход 27, 28, 32, 33
 - после нескольких промывок 28, 29
- ЭМА (этиленмалеиновый ангидрид)-сополимер 199, 200, 365, 430
- Энзайт 138
- Энзакрилы
- АА 200, 365
 - АН 200
 - полиацеталь 200
 - политиол 200
 - политиолактон 201
- Эпоксидные группы 195
- метакрилатных гелей 208
- Эритроциты, связывание 117
- Эстеролизис, оптимум pH 371
- 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, гидрохлорид 212
- N,N'-Этиленбисоацетамид 203
- Эффектор аллостерический 111
- Янтарный ангидрид 95

СОДЕРЖАНИЕ

От переводчика	5
Предисловие автора к русскому изданию	7
Глава 1. Введение	9
Список литературы	13
Глава 2. Принцип метода аффинной хроматографии, историческая справка и применение	15
Список литературы	19
Глава 3. Теория аффинной хроматографии	20
3.1. Теоретические рекомендации, выведенные из рассмотрения равновесной модели	20
3.1.1. Равновесная модель для сорбции с постоянной константой связывания	20
3.1.2. Равновесная модель для элюирования путем изменения K_d	26
3.1.3. Равновесная модель для элюирования конкурентным ингибитором	20
3.1.4. Математическое моделирование результатов колоночной хроматографии	32
3.1.5. Заключение	34
3.2. Теория кооперативного связывания в рамках теории тарелок	36
3.2.1. Изотерма связывания олигоадениловой кислоты с полиуридилиновой кислотой	36
3.2.2. Кооперативная адсорбционная колоночная хроматография	38
3.2.3. Характерные особенности кооперативных адсорбционных хроматограмм	40
3.3. Статистическая теория хроматографии применительно к аффинной хроматографии	43
Список литературы	43
Глава 4. Применение аффинной хроматографии для количественной оценки специфического комплексообразования	44
4.1. Определение констант диссоциации по данным элюирования	45
4.2. Определение констант диссоциации по данным фронтального анализа	51
4.3. Кооперативное элюирование олигоадениловой кислоты в хроматографии на иммобилизованной полиуридилиновой кислоте	55
4.4. Другие методы количественной оценки взаимодействий с иммобилизованными аффинными лигандами	58
Список литературы	61
Глава 5. Общие вопросы связывания на аффинном сорбенте	62
5.1. Стерическая доступность	64
5.2. Конформация присоединенного аффинанта	73
5.3. Концентрация аффинанта на матрице	75

5.4. Концентрация белков, время уравнивания и скорость потока	81
5.5. Влияние температуры	86
5.6. Влияние pH и ионной силы	90
5.7. Элюирование конкурентными аффинными лигандами	92
5.8. Неспецифические влияния	94
5.8.1. Влияние на неспецифическую сорбцию ионной силы	94
5.8.2. Применение теории Дебая — Хюккеля при изучении зависимости константы равновесия адсорбции и скорости десорбции фермента с замещенных гелей от ионной силы	96
Список литературы	102

Глава 6. Выбор аффинных лигандов 104

6.1. Высокоспецифичные сорбенты и сорбенты с групповой специфичностью	104
6.2. Выделение ферментов, ингибиторов и кофакторов	108
6.3. Иммуноаффинная хроматография	114
6.4. Выделение лектинов, гликопротеинов и сахаридов	116
6.5. Выделение рецепторов. Связывание и транспорт белков	122
6.6. Выделение SH-белков и пептидов	124
6.7. Выделение специфических пептидов	126
6.8. Выделение нуклеиновых кислот и нуклеотидов	130
6.9. Выделение липидов, гормонов и других веществ	133
6.10. Выделение клеток и вирусов	135
6.11. Продажные нерастворимые аффинные сорбенты	137
Список литературы	148

Глава 7. Гидрофобная хроматография, ковалентная аффинная хроматография, аффинное элюирование и родственные методы 151

7.1. Гидрофобная хроматография	151
7.2. Ковалентная аффинная хроматография	158
7.3. Аффинное элюирование	160
7.4. Аффинная пертурбация плотности	165
7.5. Аффинный электрофорез	166
7.6. Металлохелатная аффинная хроматография	170
Список литературы	172

Глава 8. Нерастворимые носители и наиболее распространенные методы иммобилизации лиганда 174

8.1. Требования, предъявляемые к характеристикам носителей	175
8.2. Обзор наиболее распространенных нерастворимых носителей и методов присоединения к ним	177
8.2.1. Целлюлоза и ее производные	177
8.2.2. Диаальдегидкрахмал — метилэцедианилин (К—МДА)	181
8.2.3. Декстрановые гели	183
8.2.4. Агароза и ее производные	184
8.2.5. Соплимер этилена и малеинового ангидрида	199
8.2.6. Полиакриламидные носители и их производные	200
8.2.7. Оксикалметакрилатные гели	205
8.2.8. Стекло и его производные	208
8.2.9. Другие носители	210
8.3. Пространственные группы	210
8.4. Блокирование непрореагировавших групп	216
8.5. Десорбция присоединенного аффинного лиганда	219

8.6. Общие замечания, касающиеся выбора сорбентов, пространственных групп и методов связывания и блокирования	225
Список литературы	232
Глава 9. Характеристика носителей и иммобилизованных аффинных лигандов	236
9.1. Методы определения неспецифической сорбции	237
9.1.1. Определение адсорбционной емкости	237
9.1.2. Определение остаточных отрицательно заряженных групп	237
9.2. Определение активируемых и активных групп	238
9.2.1. Определение карбоксильных, гидразидных и аминных групп кислотнo-основным титрованием	238
9.2.2. Определение свободных карбоксильных групп	239
9.2.3. Определение свободных аминогрупп в полимерах путем конденсации с 2-окси-1-нафталальдегидом	239
9.2.4. Определение азидных групп	239
9.2.5. Цветная реакция с 2,4,6-тринитробензолсульфонатом натрия	240
9.2.6. Флуорескаминный метод быстрого определения следовых количеств аминогрупп	241
9.2.7. Определение оксирановых групп	241
9.2.8. Определение емкости эфирных л-нитрофенильных производных оксиалкилметакрилатных гелей (НФОМ)	242
9.2.9. Определение степени замещения бензилированной селфарозы, сшитой дибромпропанолом	242
9.2.10. Определение винильных групп	242
9.2.11. Определение сульфгидрильных групп	243
9.3. Определение иммобилизованных аффинных лигандов	243
9.3.1. Дифференциальный анализ	244
9.3.2. Спектрофотометрические методы	244
9.3.3. Кислотно-основное титрование	246
9.3.4. Определение иммобилизованных белков, пептидов, аминокислот, нуклеотидов, углеводов и других веществ после их освобождения с помощью кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза	247
9.3.5. Определение количества связанного аффинного лиганда элементным анализом	248
9.3.6. Определение меченых аффинных лигандов	249
9.3.7. Колориметрическое определение иммобилизованного диаминопропиламина с нингидрином	249
9.3.8. Определение иммобилизованных белков по содержанию триптофана	249
9.4. Титрование активных центров иммобилизованных протеиназ	250
9.5. Исследование конформационных изменений иммобилизованных белков	253
9.6. Распределение белков, связанных с нерастворимыми носителями	255
Список литературы	256
Глава 10. Общие вопросы сорбции, элюирования и неспецифического связывания	258
10.1. Условия сорбции	258
10.1.1. Влияние температуры, pH и солей	259
10.1.2. Практические указания для проведения сорбции	264

10.2. Условия элюирования	266
10.2.1. Практические указания для проведения десорбции	267
10.2.2. Влияние гетерогенности иммобилизованных аффинных лигандов	272
10.2.3. Установление оптимальных условий и эффекта насыщения	275
10.3. Неспецифическая сорбция	276
10.4. Регенерация и хранение аффинных колонок	279
Список литературы	280

Глава 11. Примеры применения аффинной хроматографии 282

11.1. Выделение биологически активных веществ	367
11.2. Разделение D,L-триптофана аффинной хроматографией на колонке с иммобилизованным на агарозе бычьим сывороточным альбумином	367
11.3. Полусинтетическая нуклеаза и комплементарное взаимодействие нуклеотидных фрагментов	368
11.4. Изучение взаимодействий биологически активных веществ	371
11.5. Исследование механизмов действия ферментов	374
11.6. Молекулярная структура интерферонов фибробластов и лейкоцитов, исследованная аффинной хроматографией с лектинами и гидрофобией хроматографией	377
11.7. Иммуноанализ	380
11.7.1. Твердофазный радиоиммуноанализ	380
11.7.2. Анализ на иммуносорбенте со связанным ферментом (ЭЛИСА)	382
11.7.3. Микрофлуориметрический иммуноанализ	383
11.8. Специфическое удаление антител к бычьему сывороточному альбумину (БСА) <i>in vivo</i> с помощью экстракорпорального протока через БСА, иммобилизованный на нейлоновых микрокапсулах	383
Список литературы	385

Глава 12. Иммобилизованные ферменты 420

12.1. Классификация иммобилизованных ферментов	420
12.2. Присоединение ферментов к нерастворимым носителям и активность иммобилизованных ферментов	422
12.3. Стабильность иммобилизованных ферментов	431
12.3.1. Устойчивость при хранении	432
12.3.2. Зависимость устойчивости от pH	433
12.3.3. Термическая устойчивость	433
12.3.4. Устойчивость к денатурирующим агентам	434
12.3.5. Повышение устойчивости	436
12.4. Применение иммобилизованных ферментов	436
12.4.1. Аффинные лиганды	436
12.4.2. Исследование стабилизированных молекул ферментов и их субъединиц	437
12.4.3. Модели биологических систем	439
12.4.4. Применение иммобилизованных ферментов	441
12.5. «Синтетическая биохимия»	443
Список литературы	444

Дополнения	447
----------------------	-----

Предметный указатель хроматографируемых веществ	453
---	-----

Предметный указатель	458
--------------------------------	-----

Я. Туркова

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Научный редактор Т. И. Почкаева. Мл. научный ред. И. И. Землячева.
Художник И. Д. Богачев. Художественный редактор В. И. Шаповалов.
Технический редактор З. И. Резник. Корректор Т. П. Пашковская.

ИБ № 1985

Сдано в набор 28.12.79. Подписано к печати 25.04.80. Формат 60×90^{1/16}.

Бумага типографская № 1. Гарнитура латинская. Печать высокая.

Объем 14,75 бум. л. Усл. печ. л. 29,50. Уч.-изд. л. 37,11.

Изд. № 3/0396. Тираж. 4.300 экз. Зак. № 6. Цена 5 р. 20 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., д. 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном
комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.